Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert-Koch-Institutes Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Zur oralen Immunisierung von Mäusen mit inaktivierten S. typhi murium-Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem und inkomplettem Freundschen Adjuvans

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nikolaus Graben
aus Hagen

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0015

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert-Koch-Institutes Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Zur oralen Immunisierung von Mäusen mit inaktivierten S. typhi murium-Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem und inkomplettem Freundschen Adjuvans

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nikolaus Graben
aus Hagen

Referent : Prof. Dr. H. Raettig

Korreferent : Prof. Dr. B. Schmidt

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 11.10.1971

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Aufgabenstellung 5

B. Historischer Überblick über die Verwendung von Adjuvantien bei der oralen Immunisierung 7

C. Material und Methoden 15

D. Versuche

I. Stabilität von Wasser-in-Öl-Emulsionen aus Freundschem Adjuvans und Olivenöl unter verschiedenen in-vitro-Bedingungen 24

II. Verträglichkeit des Freundschen Adjuvans bei oraler und subcutaner Applikation 28

III. Bestimmung einer optimalen Dosierung einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium Bakterien. 34

IV. Veränderung von Impfrhythmus und Gesamtdosis der Emulsion bei konstanter Antigenmenge 39

V. Einfluß des Sättigungszustandes der Versuchstiere auf die Wirkung einer oral gegebenen Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium Bakterien 43

VI. Untersuchungen über die Resorptions- und Infektionsbakteriämie nach der oralen Gabe virulenter S. typhi murium Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus kompletttem Freundschen Adjuvans 47

VII. Wirkung einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus Olivenöl und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium Bakterien 53

VIII. Hauptversuch
Orale und subcutane Immunisierung von Mäusen mit S. typhi murium Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem und inkomplettem Freundschen Adjuvans 60

E. Diskussion 82

F. Zusammenfassung 98

G. Literaturverzeichnis 101

A. Aufgabenstellung

Das ursprüngliche Thema dieser Arbeit sollte darin bestehen, anhand des von RAETTIG (78) entwickelten Infektionsmodells nachzuprüfen, inwieweit das komplette und das inkomplette Freundsche Adjuvans geeignet sind, den Erfolg der oralen Immunisierung zu verbessern. Im Laufe der Zeit zeigte sich, daß eine sinnvolle Planung der Versuche und die Auswertung ihrer Ergebnisse nicht von der Beantwortung der Frage zu trennen waren, ob das Freundsche Adjuvans als Mineralöl überhaupt enteral resorbiert werden kann. Ein Teil meiner Versuche und Überlegungen beschäftigt sich daher zusätzlich zur ursprünglichen Aufgabenstellung mit dem Problem der enteralen Resorption nichtverseifbarer Fette. Die auf diesem Gebiet vorhandene Literatur ist vergleichsweise spärlich und verliert dadurch an Wert, daß die veröffentlichten Einzelergebnisse nicht immer exakt verglichen werden können. Unter dem Sammelbegriff "Mineralöle" versteht man flüssige und schwerflüchtige aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen von Fettcharakter, die im Erdöl und seinen Destillationsprodukten, im Erdwachs, im Stein- und Braunkohlenteer und in einzelnen Produkten der Holz- und Torfverkohlung vorliegen (91). Es handelt sich dabei um Gemische, deren Zusammensetzung nach Herkunftsland, Ausgangsprodukt, Aufbereitungsverfahren und Verwendungszweck voneinander abweicht. Außerdem enthalten die Öle sehr oft natürliche Beimengungen oder sekundäre Zusätze, die für bestimmte Reaktionen im lebenden Organismus verantwortlich sein können. In der Literatur erscheint eine Fülle verschiedener Begriffe wie z.B. Mineralöl, Paraffinöl, Vaselinöl, Paraffinum liquidum, Petrolatum liquidum, Hydrocarbonöl u.a. mehr oder weniger synonym nebeneinander. Meist wird die Bezeichnung nur durch die Angabe der Farbe, der Konsistenz, des Herkunftslandes oder des

Verwendungszweckes unzureichend ergänzt. Unter diesen Umständen kann ein Vergleich der Versuchsergebnisse verschiedener Autoren sehr schwierig sein.
Die mir zur Verfügung stehende Methodik läßt direkte Beobachtungen zum Problem der Fettresorption nicht zu. Histologische und biochemische Verfahren lagen außerhalb des für diese Arbeit gesteckten Rahmens und müssen anderen Untersuchern überlassen werden.

B. Historischer Überblick über die Verwendung von Adjuvantien bei der oralen Immunisierung.

1. Die orale Immunisierung

Die Grundlage jeder aktiven Schutzimpfung ist die schon seit sehr langer Zeit bekannte Tatsache, daß das Überstehen einer Infektionskrankheit oder der Kontakt mit abgeschwächten Erregern gegen eine Zweitinfektion schützen können. Aus diesem rein empirischen Wissen heraus wurden bereits praktische Folgerungen und Vorbeugemaßnahmen getroffen, lange bevor die mikrobielle Ursache der Erkrankungen und die Vorgänge der spezifischen Abwehr des Makroorganismus bekannt waren. So soll es im alten China, in Indien, im vorderen Orient sowie während des Mittelalters in Europa üblich gewesen sein, sich während einer milden verlaufenden Pockenepidemie an einem leicht Erkrankten durch Einreiben von Pustelinhalt in die Haut oder Einblasen von Pockeneiter in die Nase künstlich zu infizieren, um so durch eine einmalige leichte Erkrankung zeitlebens gegen die gefürchtete Seuche gefeit zu sein. Diese primitiven Impfversuche erscheinen besonders beachtenswert unter dem Gesichtspunkt, daß offenbar ganz selbstverständlich der natürliche Infektionsweg (Kontakt- und Tröpfcheninfektion) als Impfweg gewählt wurde. - Auch die grundlegenden Versuche JENNERs (Pocken) und PASTEURs (Tollwut) knüpfen an diese alten Erfahrungen über die Immunität nach Überstehen einer Infektionskrankheit an.

Der Gedanke der oralen Immunisierung wurde bereits sehr frühzeitig verwirklicht. PASTEUR (nach DOLMAN, 2o) stellte im Jahr 188o fest, daß Hühner an einer parenteralen Anthrax-Infektion nicht starben, wenn ihnen vorher Anthrax-Bakterien mit dem Futter gegeben worden waren. Im gleichen Jahr konnten CHAMBERLAND, PASTEUR und ROUX (16) zeigen, daß Hühner, die eine Hühnercholera-Infektion überlebt hatten, gegen eine erneute Infektion immun waren.

Experimentell wissenschaftlich ausgebaut wurde die Immunisierungsmethodik besonders von EHRLICH (24). Er fütterte Mäuse mit langsam steigenden Mengen von Ricin und Abrin und konnte dadurch die letale Dosis dieser Pflanzengifte bis auf das hundert- und zweihundertfache steigern (1891). 1904 berichtet WRIGHT (113) erstmalig über die orale Immunisierung mit S. typhi.

Im Jahre 1905 kamen WASSERMANN und CITRON (108) aufgrund von Tierversuchen zu dem Schluß, daß es eine lokale Immunität geben müsse. Ihre konsequente Folgerung lautete:
" Es ist klar, daß es für Bakterien, wie beispielsweise den Typhusbacillus oder Choleravibrio, die eine bestimmte Eingangspforte, den Magen-Darm-Kanal, besitzen, in praxi das Beste und Sicherste wäre, eine lokale Immunität der Gewebe dieser Eingangspforte zu erreichen."

1906 führte LÖFFLER (63) vergleichende Untersuchungen aus, bei denen er hitzeinaktivierte S. typhi murium-Bakterien intraperitoneal, subkutan und oral als Impfstoff applizierte. Die orale Immunisierung erwies sich als die erfolgreichste.

Zu gleichartigen Ergebnissen führten u.a. die Versuche von WOLF (111) sowie von KUTSCHER und MEINICKE (61).

Der Gedanke der oralen Immunisierung wurde in der Folgezeit besonders von der sog. " Französischen Schule " vertreten, als deren Begründer Metschnikoff und Besredka gelten. Metschnikoff entwickelte die Vorstellung, daß den Phagozyten und damit den zellulären Reaktionsmechanismen die entscheidende Bedeutung bei der Infektabwehr und der Immunisierung zukomme. Sein Schüler Besredka erweiterte diese Lehrmeinung und definierte die Immunität als eine Art von lokalem Gewöhnungszustand der Organzellen an die Infektionserreger. Er postulierte, daß " jedes Bakterium seine Zelle und jede Zelle ihre Immunität hat " und lehnte den Gedanken an eine allgemeine humorale Immunität ab. Lokale Infektion und lokale Immunität bildeten für ihn eine feste funktionelle Einheit.

Dieser Gedanke von einer lokalen Immunisierung konnte sich letztlich jedoch nicht durchsetzen, da weder eine befriedigende theoretische Untermauerung noch eine empirische Beweisführung gelangen. Dagegen gewann die Lehrmeinung der sog. " Deutschen Schule " zunehmend an Einfluß. Sie ging auf die Seitenkettentheorie Ehrlichs zurück und stellte den humoralen Mechanismus der Immunität in dem Mittelpunkt ihrer Theorie. Die Überlegenheit dieser Lehrmeinung entsprang nicht zuletzt aus der Annahme, daß zwischen der Höhe des Antikörpertiters im Serum und der tatsächlichen, d.h. belastbaren Immunität ein direkter Zusammenhang besteht. Unter dieser Voraussetzung erschien es möglich, anhand der Titerhöhe den Erfolg einer Immunisierung qualitativ und quantitativ exakt zu messen. Da nur bei parenteraler Applikation des Antigens eine sofortige starke Bildung von Serum-Antikörpern eintritt, wurde dieser Weg der Antigengabe schließlich für einzig sinnvoll gehalten.

Es ist als das besondere Verdienst RAETTIGs (77, 8o) anzusehen, in neuerer Zeit den Gedanken der lokalen Immunisierung wieder aufgegriffen und auch auf die Bildung humoraler Antikörper nach oraler Antigengabe hingewiesen zu haben.

2. Verwendung von Adjuvantien bei der oralen Immunisierung.

Der wahrscheinlich erste Versuch, durch Adjuvantien die orale Immunisierung zu verbessern, wurde von McCLINTOCK, CHARLES und KING (18) im Jahre 19o9 unternommen. Sie versuchten, durch die Gabe von Natriumbicarbonat, von Opium oder von in Chloroform gelöstem Salol vor der oralen Impfstoffapplikation die natürlicherweise im Magen-Darm-Kanal auftretenden Antigenverluste zu reduzieren und so bei gleicher Dosis einen besseren Immunisierungserfolg zu erzielen.

Ein anderer Versuch, die Einwirkung der Verdauungssäfte auf das Antigen zu verringern, bestand darin, abgetötete Bakterienkulturen in Keratinkapseln zu verabreichen. Diese

Untersuchungen wurden von LUMIERE und CHEVROTIER (64) sowie von HIDA und TOYODA (49) durchgeführt.

Im Jahre 1918 kam BESREDKA (5, 6) nach Zusammenstellung der einschlägigen Literatur und eigenen Tierversuchen zu der Auffassung, daß sich - mit Ausnahme der Shigellen - überzeugende Impferfolge nur mit lebenden Keimen erzielen lassen. Er deutete diese Ergebnisse dahingehend, daß die gesunde und nicht geschädigte Darmwand aufgrund ihrer schützenden Schleim-schicht und ihres histologischen Aufbaues Bakterien nur auf-nimmt, wenn diese als lebende Keime die Darmwand aktiv angreifen und schädigen oder wenn - wie bei den Shigellen - ein auch in den abgetöteten Bakterien wirksames Endotoxin entsprechende Läsionen hervorruft. Er folgerte daraus, daß bei einer oralen Immunisierung mit Salmonellen der Impfstoff mit einer oberflächenaktiven Substanz kombiniert werden müsse, die entsprechend dem Endotoxin der Shigellen die Darmschleimhaut so verändert, daß sie durchlässiger und für das Antigen aufnahmebereiter wird. Eine solche "sensibilisierende" Substanz glaubte er in der Galle gefunden zu haben. In seinen Versuchen überlebten eine Typhus-, Paratyphus- oder Cholerainfektion nur diejenigen der oral immunisierten Kaninchen, die mit Galle vorbehandelt worden waren. Diese Beobachtung wurde von zahlreichen Autoren bestätigt, z.B. von ARLOING und SPASSITSCH (1), DIETRICH (19), GLOTOWA (39), GOLOVANOFF (4o), HAJOS (43) und MIZUTANI (72). DIETRICH (19) prüfte am Modell der Resorption von Tetanustoxin aus dem Darm außer der Galle selbst verschiedene gallensaure Salze wie z.B. desoxycholsaures Natrium, glykocholsaures Natrium, taurochol-saures Natrium sowie Desoxycholsäure.

HAJOS (43) konnte gleichartige Erfolge auch durch die Vorbe-handlung mit Alkohol erzielen.

Im Jahr 1922 berichtet VAILLANT (1o1) erstmalig über Feld--versuche, bei denen Galle als Adjuvans verwendet wurde. In sechs französischen Ortschaften konnten Typhus- und Paratyphusepidemien durch Schutzimpfungen unter Kontrolle gebracht werden. Dabei wurde vergleichend subkutan und oral mit " vaccin bilié " geimpft. Während bei dem unbehandelten Perso--nenkreis die Erkrankungshäufigkeit bei 7,7 % lag, erkrankten die subkutan Geimpften zu 2,3 % und die oral mit " vaccin bilié Geimpften nur zu o,17 %. Die aufgetretenen Nebenwir--kungen wurden von dem Autor als unbedeutend geschildert.

Positive Erfahrungen mit Galleimpfstoffen wurden von groß angelegten Feldversuchen in Rumänien von CATANCUZENE und PANAITESCU (15), in Polen von STARZYNSKI (94), in Rußland von NONEVIC (75) und in Italien von BROTZU (9, 1o, 11) mit--geteilt. Von anderen Untersuchern wie ISHIHARA (52), KLÜCHIN und WIGODTSCHIKOFF (55), LUSENA und ROVIDA (65), MATSUOKA (7o) und TRON (98, 99) wurde dagegen die Vorbehandlung mit Galle abgelehnt. Sie beobachteten u.a., daß es ein sicheres Intervall zwischen unwirksamer und toxischer Dosis nicht gibt, und daß auch durch therapeutische Dosen von Galle bei den Versuchstieren schwere Schädigungen der Darmwand bewirkt wurden, denen die Tiere unter dem Bild einer Diarrhoe oder einer Coli-Autoinfektion erlagen. Außerdem hätte bei einer Umrechnung der beim Kaninchen wirksamen Gallendosis auf das Körpergewicht des Menschen jeder Impfling etwa 5oo ml Galle trinken müssen (54).

KLÜCHIN und WIGODTSCHIKOFF (54) griffen den Gedanken der darmwandsensibilisierenden Wirkung der Shigellen auf. Sie verabreichten als Vorbehandlung bei 6o°C hitzeinaktivierte Shiga-Kruse-Bakterien in der Dosierung von 3 x $1o^{1o}$ Keimen pro 2 kg Kaninchen. Nach ihren Angaben sind hitzeinaktivierte Shigellen als Adjuvans bei der oralen Typhusimmunisierung sehr geeignet, da ohne Schädigung der Darmwand oder anderer

unerwünschter Nebenwirkungen eine erhebliche Verbesserung des Impferfolges eintritt.

NEUBERG und von WASSERMANN (74) führten die Hydrotropika in die Technik der oralen Immunisierung ein. In dem von ihnen entwickelten " Immunoid-Impfstoff " befand sich neben dem Typhus-Antigen Natrium benzoicum als " sensibilisierende " Substanz.

REITER (85), REITER und KUOKAWA (86) sowie REITER und SOLDIN (87) bestätigten die verstärkende Wirkung von Natr. benz. bei oraler und perkutaner Anwendung von Typhusimpfstoff. Sie äußerten jedoch gleichzeitig den Verdacht, daß Natr. benz. eventuell die antigenetischen Eigenschaften des Impfstoffes verändert und herabsetzt.

Eine positive Wirkung von Natr. benz. bei oraler Immunisie--rung gegen Paratyphus B wird auch von FRÄNKEL und SCHULTZ (31) beschrieben. Diese Autoren wiesen jedoch auch darauf hin, daß bei höheren Dosen die Versuchstiere an Coli-Autoin--fektion erlagen. Sehr frühzeitig war die Wirkung von Natr. benz. als Adjuvans neben zahlreichen anderen Stoffen auch von DIETRICH (19) untersucht worden, doch scheinen diese Ver--suche nicht veröffentlicht worden zu sein.

Von positiven Ergebnissen bei Feldversuchen mit dem Immunoid--Impfstoff wird von MANTEY (66) in Belzig und HIRSCH (51) in Osijek in Südslawien berichtet. In einer großangelegten Aktion mit weit über 1o ooo oralen Impfungen mit Typhus-Immunoid konnten die Stadt Osijek und die angrenzenden Gebiete von der vorher endemischen Seuche befreit werden.

Bei einer Epidemie in Hannover wurde der Immunoid-Impfstoff mit Erfolg und ohne nennenswerte Nebenwirkungen u.a. auch an mehreren hundert Schulkindern erprobt (FRÄNKEL, 3o).

Als sehr stark oberflächenaktive Substanzen gelten die Saponine. BECKER (3) prüfte sie auf ihre Eignung als Adjuvans am Beispiel der Resorption von Diphterieserum aus dem Rectum.

Er konnte einen gewissen, aber nicht überzeugenden Erfolg feststellen.

In den letzten Jahren wurde der Gedanke, die Wirksamkeit der oralen Immunisierung durch Adjuvantien zu verbessern, erneut von RAETTIG (83) aufgegriffen. In einer von SCHMUDDE (93) durchgeführten Versuchsreihe sollte die Wirkung des Dimethyl--sulfoxyd (DMSO) als Adjuvans geklärt werden. DMSO vermag bei guter Verträglichkeit die Permeabilität von Haut und Schleimhäuten hochgradig zu steigern. Die Untersuchungen führten zu dem erstaunlichen Ergebnis, daß DMSO allein die Resistenz der Versuchstiere gegen eine nachfolgende Typhusinfektion erhöht, während es in Kombination mit dem Impfstoff zu keiner Immunisierung führt. Diese zunächst widersprüchlich erschei--nenden Resultate konnten durch den Nachweis erklärt werden, daß DMSO die antigenetischen Eigenschaften des Impfstoffes zerstört.

3. Orale Immunisierung mit dem Freundschen Adjuvans

Der Gedanke, durch die Verwendung von Adjuvantien eine " Sensibilisierung " im Hinblick auf das gleichzeitig oder später gegebene Antigen zu erzeugen, geht im Kern auf die Vorstellungen BESREDKAs zurück, der die (lokale) Immunität als eine besondere Form der Wechselbeziehung zwischen dem infizierenden Keim und den einzelnen Zellen des betroffenen Organs definierte. Dementsprechend lassen sich praktisch alle bei der oralen Immunisierung versuchten und zuvor aufgeführten Substanzen unter dem Gesichtspunkt eines gleichartigen Wirkungsprinzips zusammenfassen: Die Aufnahmebereitschaft der Darmschleimhaut soll für das spezifische Antigen gesteigert werden. Dieser speziellen Aufgabenstellung kann das Freundsche Adjuvans weder in seiner inkompletten, noch in seiner kompletten Modifikation gerecht werden. Gereinigte und von irritierenden Zusätzen freie Mineralöle verhalten sich an

der Oberfläche von Haut und Schleimhäuten weitgehend inert. Eine Permeabilitätssteigerung oder ein ähnlicher Effekt ist daher von dem Freundschen Adjuvans nicht zu erwarten. Trotzdem erscheint aufgrund theoretischer Überlegungen eine Steigerung des Impferfolges als durchaus möglich. Ich verweise auf die Diskussion.

C. Material und Methoden

1. Das Freundsche Adjuvans

Ein Adjuvans des Freundschen Typus ist ein Mineralöl, welches als Ölphase mit einer das Antigen enthaltenden wässrigen Phase in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion kombiniert wird. Wenn in dem Mineralöl abgetötete Mykobakterien suspendiert sind, nennt man das Adjuvans " komplett ". Ohne den Zusatz von Mykobakterien gilt das Adjuvans als " inkomplett ". Grundsätzlich ist jedes Mineralöl mit niedrigem spezifischen Gewicht als Freundsches Adjuvans geeignet (Freund, 34). Im engeren Sprachgebrauch wird unter dem Begriff Freundsches Adjuvant ein Gemisch aus dem Mineralöl Bayol F und dem Emulgator Arlacel A verstanden. Komplettes Adjuvans enthält Mycobacteria butyrica.

Bayol F ist ein Mineralöl mit niedrigem spezifischen Gewicht und geringer Viskosität. Es wird von der Firma Esso & Co., New York, geliefert.

Arlacel A ist der Handelsname für den Emulgator " mannide monoolate ", der von der Firma Atlas Powder Company, Delaware/Maryland, hergestellt wird.

Mycobacteria butyrica sind abgetötete Mykobakterien. In 1o ml des Freundschen Adjuvans sind 5 mg abgetöteter und getrockneter Mykobakterien suspendiert.

Nach Freund (34) liegt das Mischungsverhältnis dieser Komponenten bei folgenden Volumenverhältnissen:

Bayol F: Arlacel A: wässr. Antigenphase = 8,5 : 1,5 : 1o

(+ 5 mg abgetöteter und getrockneter Mykobakterien in 1o ml Adjuvans)

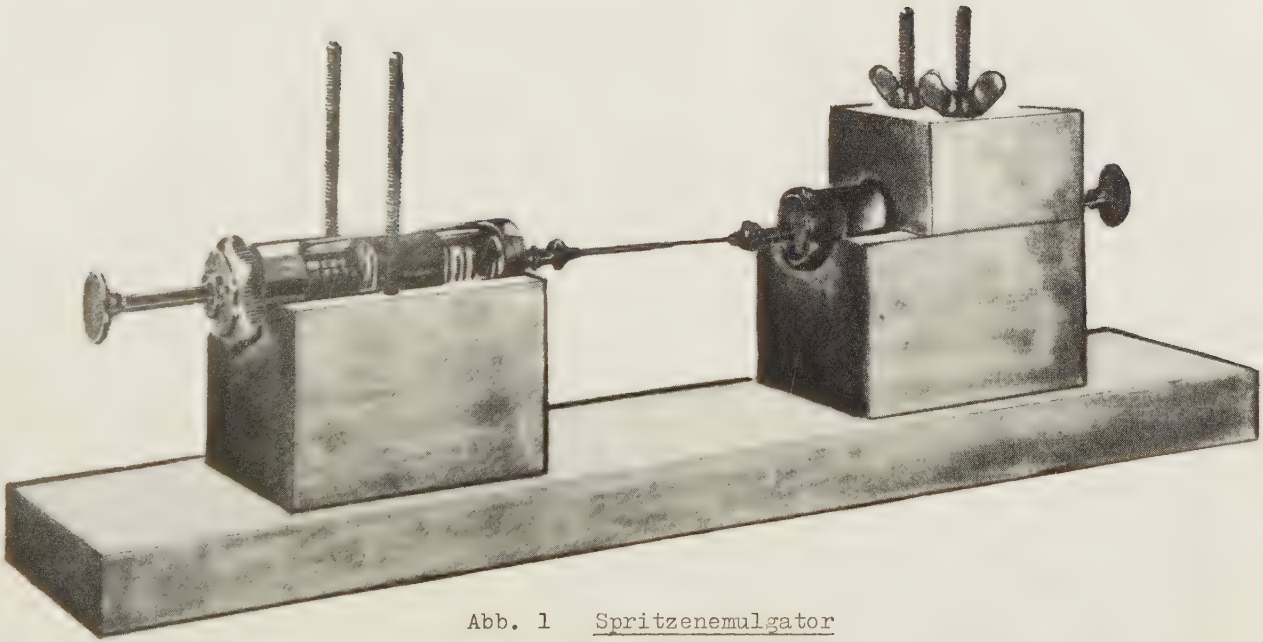

Abb. 1 Spritzenemulgator

Hergestellt nach den Angaben von Berlin und Mc. Kinney. Die Kopfplatte des linken Lagerbockes ist entfernt.

Das Freundsche Adjuvans kann aus den angegebenen Substanzen selbst gemischt oder gebrauchsfertig von den Difco-Laboratories, Detroit/Michigan, bezogen werden.

Selbst gemischtes Freundsches Adjuvans wurde bei den vorliegenden Untersuchungen nur in einzelnen Gruppen des Versuches II verwendet, wobei Mycobacteria butyrica durch Mycobacteria smegmatis ersetzt wurden. Alle anderen Versuchsansätze wurden mit komplettem und inkomplettem Adjuvans der Difco-Werke durchgeführt.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die von Freund empirisch gefundenen Mischungsoptima nur bei der Verwendung von Bayol F und Arlacel A einerseits und abgetöteter Salmonellen als Antigen andererseits gelten. Eine qualitative Veränderung der Ölphase oder ein Wechsel des Antigens führt zu einer Verschiebung der optimalen Mischungsverhältnisse (37, 27, 28).

2. Herstellung der Wasser-in-Öl-Emulsion mit Hilfe des Spritzenemulgators.

Eine Besonderheit des Freundschen Adjuvans besteht darin, daß seine Wirkung nicht nur an seine qualitative und quantitative Zusammensetzung, sondern auch an den physikalischen Phasenzustand der einzelnen Substanzen gebunden ist. Eine positive Wirkung tritt nur dann ein, wenn das Mineralöl als Ölphase in einer Wasser-in-Öl-Emulsion vorliegt. Eine Öl-in-Wasser-Emulsion ist dagegen trotz identischer chemischer Zusammensetzung unwirksam (27).

Eine Wasser-in-Öl-Emulsion kann auf verschiedene Weise hergestellt werden, z.B. durch einfaches Mischen mit einem Rührstab, mit einem elektrischen Mixer oder Quirl oder durch wiederholtes Aufziehen und Ausspritzen mit einer Spritze mit weitlumiger Kanüle.

Eine einfache, aber sehr wirkungsvolle und bequem zu handhabende Apparatur zur Herstellung von Emulsionen ist der von BERLIN und Mc.KINNEY (4) beschriebene Spritzenemulgator. In Anlehnung an die Angaben der Autoren habe ich für die vorliegenden Versuche einen solchen Emulgator gebaut und in ihm alle benötigten Emulsionen hergestellt. Das Gerät ist in Abb. 1 dargestellt.

Auf einer Grundplatte werden zwei Holzblöcke so angeordnet, daß sich zwei in diesen Blöcken festgeschraubte 1o-ml- - Spritzen mit ihren Ansatzstutzen für die Kanülen genau gegenüberstehen. Zwischen beiden Spritzen befindet sich ein Verbindungsstück, welches aus zwei ineinandergeschobenen und gut verlöteten Kanülen der Größe 1 und S III gefertigt wurde. Zur Stabilisierung wurde dieses Verbindungsstück in ein gleichlanges Leichtmetallrohr mit Blei eingegossen.

Durch dieses dünnlumige Verbindungsrohr kann Flüssigkeit beliebig oft und ohne Luftzutritt von einer Seite zur anderen gepumpt werden, wobei eine gründliche Durchmischung bzw. Emulgierung eintritt. Ein besonderer Vorteil des Spritzenemulgators besteht darin, daß die Emulsion steril und frei von störenden Schaumbläschen bleibt.

Zu Beginn wird in die eine Spritze eine bestimmte Menge Freundsches Adjuvans und in die zweite eine gleichgroße Menge der wässrigen Bakteriensuspension aufgezogen. Nach der Koppelung der Spritzen durch das Verbindungsstück wird nun eine kleine Teilportion der wässrigen Flüssigkeit in das Mineralöl der Gegenseite gespritzt und darauf eine etwas kleinere Menge wieder zurückgepumpt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis die gesamte wässrige Phase in der Ölphase emulgiert ist. Nach etwa 15-maligem Hin- und Herpumpen erhält man auf diese Weise eine stabile Wasser-in-Öl- -Emulsion von weißer Farbe und dicklicher visköser Beschaffenheit.
Bei der Herstellung von mehr als 4 oder 5 ml Emulsion

erwies es sich als günstig, die wässrige Phase nicht auf einmal, sondern in mehreren kleinen Teilportionen zuzusetzen, und zwar so, daß die folgende Portion erst dann zugegeben wurde, wenn die vorhergehende völlig in der Ölphase emulgiert war.

Die Stabilität der Emulsion läßt sich im sog. " Tropfentest " prüfen (34). Während Öl oder eine Öl-in-Wasser-Emulsion auf einer Wasseroberfläche bei Zimmertemperatur sofort zerlaufen, behält ein Tropfen einer stabilen Wasser-in-Öl-Emulsion seine Form und zerläuft nicht.

Die im Spritzenemulgator hergestellten Emulsionen erwiesen sich für sehr lange Zeit als stabil (siehe Versuch I).

3. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ausschließlich NMRI-Mäuse (Naval--Medical-Research-Institute) aus der Zucht von Frau Wilke, Berlin, verwendet. Das Gewicht der Tiere lag bei Versuchsbeginn im Durchschnitt bei 15 bis 18 Gramm, das Alter bei höchstens 8 Wochen. Die Tiere wurden in Plastikkäfigen zu 25 bis 3o Mäusen gehalten und mit Altromin-Trockenfutter und Leitungswasser ernährt. Die Kontrolltiere lebten unter den gleichen Versuchsbedingungen. Insgesamt wurden in den Versuchen fast 5ooo Mäuse verbraucht.

4. Impfstoffherstellung

Als spezifisches Antigen verwendete ich 5 Stämme von S. typhi murium (6616, 6639, 6643, 6656 und 6659).

Die Bakterienkultur erfolgte auf Agarböden in großen Petrischalen oder in sogenannten Penicillinflaschen. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C wurde der gewachsene

Bakterienrasen mit dem Glasspatel abgeschabt oder mit Hilfe kleiner Glasperlen durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen des Gefäßes abgeschüttelt und mit dem natürlicherweise vorhandenen Kondenswasser abgeschwemmt. Die abgeschwemmte Suspension wurde eine Stunde lang bei 3ooo Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Überstand abgehebert und verworfen. Die als Bodensatz zurückbleibenden Bakterien wurden mit einer der dem abgeheberten Überstand gleich großen Menge an phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,4) aufgeschwemmt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt.

Nach dem Waschen wurde durch Ausplattierung die Keimzahl bestimmt, welche fast immer in der Größenordnung von $1o^{11}$ Keimen /ml lag. Die Bakteriensuspension wurde schließlich bei $1oo^{o}$ C / 3 min. im Wasserbad inaktiviert und anschließend auf ihre Sterilität geprüft. Dieses Verfahren entspricht der Inaktivierungsmethode von KORDES (58).

Je nach Versuchsanordnung wurden Impfstoffsuspensionen mit einer Keimzahl von $1o^{9}$ oder $1o^{1o}$ Keimen /ml benötigt. Diese Gebrauchssuspensionen ließen sich einfacherweise durch Verdünnung der Ausgangssuspension mit physiologischer Kochsalzlösung herstellen.

5. Dosierung und Immunisierungsrhythmus

Dosierung und Immunisierungsrhythmus wurden von der von RAETTIG (78) entwickelten Methodik übernommen. Danach bestehen optimale Immunisierungsbedingungen, wenn die Keimzahl der Gesamtdosis etwa $1o^{9}$ beträgt und diese in gleichgroßen Teildosen an 1o Tagen gegeben wird. In den vorliegenden Versuchen wurde diese Methodik in 2 Punkten geringfügig geändert. Zwischen der 5. und 6. oralen Antigengabe wurden aus arbeitstechnischen Gründen zwei freie Tage eingeschoben, so daß die

Immunisierung jeweils vom 1. bis 5. und vom 8. bis 12. Versuchstag erfolgte.

Außerdem erwies es sich als notwendig, die Keimzahl des Impfstoffes auf $1o^{1o}$ K/ml heraufzusetzen, da die orale Unverträglichkeit des Freundschen Adjuvans nur Einzeldosen in der Größenordnung von 1/1oo ml erlaubte und zwischen Ölphase und wässriger Phase in der Emulsion ein konstantes Verhältnis besteht.

Die Gesamtdosis von $1o^9$ Keimen wurde durch diese Maßnahme nicht geändert, da die Einengung des Volumens auf 1/1o durch die Erhöhung der Keimzahl / ml um das 1o-fache ausgeglichen wurde.

6. Infektion

Innerhalb eines Versuches wurden alle Mäuse zum gleichen Zeitpunkt mit o,25 ml einer 6 Stunden alten Kultur eines virulenten Stammes von S. typhi murium oral mit der Schlundsonde infiziert. Die Keimzahl der Infektionssuspension lag bei $1o^9$ K/ml.

Der Infektionstag war der 1o. Tag nach der letzten oralen Gabe bzw. subkutanen Injektion der Testsubstanzen und der 22. Tag seit Beginn des Versuches.

Als Meßgröße für den erzielten Impfschutz wurde die Senkung der Mortalität gewählt. Dieser Methode ist dadurch eine zeitliche Grenze gesetzt, daß Mäuse mit steigendem Lebensalter gegen eine Infektion mit S. typhi murium in zunehmenden, aber im Einzelfall im voraus nicht bestimmbaren Maße resistent werden. Bei Mäusen, die älter als 12o Tage sind, läßt sich erfahrungsgemäß auf oralem Wege nur schwer und unregelmäßig eine Mortalität von 5o % erreichen.

Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wurden bei den Infektionsversuchen nur Mäuse verwendet, die nicht älter als 8 Wochen bei Versuchsbeginn waren. Außerdem wurden die Tiere

nur 24 Stunden in Beobachtungsquarantäne gehalten. Dieser Zeitraum erwies sich als ausreichend, um z.B. durch den Transport geschädigte Tiere festzustellen und auszusondern.

7. Immunisierungstechnik

Die Impfstoffe wurden den Mäusen durch eine Schlundsonde gegeben. Als Sonde diente eine Knopfkanüle oder eine abgewinkelte und abgestumpfte Kanüle der Größe 1. Um eine exakte Dosierung sicherzustellen, wurden die verhältnismäßig kleinen Mengen von durchschnittlich o,o2 ml mit einer Tuberkulinspritze verabreicht. - Diese Form der oralen Impfstoffgabe wurde von den Versuchstieren gut und ohne Schädigung vertragen.

8. Bewertungsmethoden und statistische Sicherung

Zur Darstellung und Bewertung des erreichten Impfschutzes benutzte ich folgende Parameter:

1. Die Mortalitätskurve	Sie gibt an, wieviel Prozent der Versuchstiere bis zu einem bestimmten Tag gestorben sind.
2. Die Epidemiekurve	Sie zeigt an, wieviel Prozent der Versuchstiere an jedem einzelnen Tag gestorben sind.
3. Die Endmortalität	Sie stellt die prozentuale Sterblichkeit am Ende des Versuches dar. Als Stichtag wurde der 25. Tag post inf. gewählt, weil später praktisch keine Tiere mehr verstarben. Da die Infektion der Versuchstiere stets am frühen Vormittag

durchgeführt wurde, habe ich diesen Tag bereits als ersten Tag post infect. bezeichnet. Bei zeitlichen Vergleichen mit Arbeiten, in denen der Infektionstag gesondert gezählt wird, ergibt sich somit eine Differenz von einem Tag.

4. Den Wirkungsindex — Er wird nach der Formel $\frac{(b-a) \cdot 100}{b}$ berechnet. Dabei ist

a = Endmortalität des Versuches
b = Endmortalität der negativen Kontrollgruppe

5. Den mittleren Sterbetag — Er errechnet sich aus der Formel $\frac{\text{Summe (Tagestote x Tag)}}{\text{Gesamttote}}$

Die statistische Sicherung der gefundenen Werte wurde anhand der " Neuen graphischen Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen " von KOLLER (57) vorgenommen. Es bedeuten

D_z = Größte zugelassene Zufallsdifferenz

D_b = Beobachtete Differenz

$\frac{D_b}{D_z} = E$ E ist die Echtheit einer gefundenen Differenz.
Für E > 1 ist der Unterschied statistisch gesichert.
Für E < 1 ist die Differenz nicht mehr gesichert.

Die Koller-Tafeln schließen einen Fehlerbereich von 1 % ein. Bei der Bestimmung der größten zugelassenen Zufallsdifferenz wurde stets von der kleineren Ausgangshäufigkeit ausgegangen und die Grenzdifferenz nach oben bestimmt.

D. Versuche

Versuch I

Stabilität von Wasser-in-Öl-Emulsionen aus Freundschem Adjuvans und Olivenöl unter verschiedenen in-vitro-Bedingungen.

Oral verabreichte Substanzen unterliegen der Verdauungstätigkeit des Magen-Darm-Kanals. Bei der Gabe einer Wasser-in-Öl--Emulsion stellt sich daher als erstes die Frage, ob die Emulsion bei der Passage des Magens und während ihres Aufenthaltes im Darm stabil bleibt oder in ihre ölige und wässrige Phase zerfällt. Beide Situationen ergeben grundsätzlich unterschiedliche Ausgangspunkte für eine mögliche Resorption.

In den folgenden in-vitro-Testen wurde die Stabilität der in den weiteren Versuchen verwendeten Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von hitzeinaktivierten S. typhi murium-Bakterien und zum Vergleich die einer entsprechend hergestellten Wasser-in-Öl--Emulsion aus Olivenöl geprüft. Mit Ausnahme der unterschiedlichen Öle hatten beide Emulsionen die gleiche Zusammensetzung und folgende Volumenverhältnisse:

Öl: Emulgator: wässrige Antigensuspension = 8,5 : 1,5 : 1o
Als Emulgator diente in beiden Emulsionen Arlacel A.
Die Versuche wurden nach Art des von Freund beschriebenen " Tropfentestes " durchgeführt, der in dem Abschnitt " Material und Methoden " genauer beschrieben ist. Kleine Petrischalen wurden mit je 5o ml Flüssigkeit gefüllt und bei Zimmertemperatur an einem erschütterungsfreien Standort aufbewahrt.
Bei Versuchsbeginn wurden je 5 bis 6 Tropfen Emulsion auf die Oberfläche gegeben und zunächst in stündlichen, später in täglichen Abständen kontrolliert.

Stabilität einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus
Olivenöl und Mineralöl im "Tropfentest" .

Testflüssigkeiten	Olivenölemulsion	Mineralölemulsion
Aqua dest.	bis 20 Stunden stabil	länger als 7 Wochen stabil
NaCl, physiolog.		
HCl, 1/10 n		
Pepsaletten in NaCl	wenige Stunden stabil	
Pankreatan in NaCl		
Pankreatan comp. in NaCl		
Pankreatan comp. + + Pepsaletten in NaCl		5-6 Wochen stabil

Tabelle 1

Aufbau und Ergebnis des Versuches sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Die bei dem Versuch verwendeten Präparate " Pepsaletten ", " Pankreatan " und " Pankreatan comp. " stellte freundlicherweise die Firma Dr. Chr. Brunnengräber zur Verfügung. Sie weisen folgende Zusammensetzung auf:

Pepsaletten:	4oo mg Magenschleimhautextrakt
	25o mg Glutaminsäurechlorid
Pankreatan:	16 Lipase-Einheiten
	23 Amylase-Einheiten
	35 Trypsin-Einheiten (nach Willstätter)
Pankreatan comp.:	49 Lipase-Einheiten
	49 Amylase-Einheiten
	77 Trypsin-Einheiten (nach Willstätter)
	5o mg Gesamtgallensäure

Zur Herstellung der Testflüssigkeiten wurde je ein Dragee zunächst fein zerstoßen und dann mit 5o ml physiologischer NaCl aufgeschwemmt.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Sie können selbstverständlich nur mit erheblichen Einschränkungen auf die In-vivo-Verhältnisse übertragen werden, da wesentliche Faktoren wie z.B.die Einwirkung der Peristaltik, der höheren Körpertemperatur u.a.m. in dieser Versuchsanordnung nicht berücksichtigt worden sind.

Deutlich wird zunächst, daß kein Zusammenhang zwischen der Konsistenz und der Haltbarkeit der Emulsion besteht. Die Olivenöl-Emulsion ist fest und salbenartig und ihre Herstellung im Spritzenemulgator bereitet erhebliche Schwierigkeiten. Sie zerfällt in kurzer Zeit. Die flüssigere Mineralöl-Emulsion bleibt dagegen über Monate stabil. Es ist daher zu vermuten, daß sie - im Gegensatz zur Olivenöl-Emulsion - auch die Passage des Magen-Darm-Kanals stabil überstehen kann. Falls diese Annahme zutrifft, ergibt sich für das Antigen in der wässrigen Phase einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus Freund-

schem Adjuvans gegenüber demjenigen in einer einfachen wässrigen Suspension eine grundlegend geänderte Resorptionssituation. Die Wirkung des Freundschen Adjuvans bei der oralen Immunisierung wird somit wesentlich davon abhängen, inwieweit die stabile Wasser-in-Öl-Emulsion resorbierbar ist. Auf dieses Problem wird in der Diskussion noch ausführlich eingegangen werden.

Versuch II

Verträglichkeit des Freundschen Adjuvans bei oraler und subkutaner Applikation.

Versuche, bei denen Wasser-in-Öl-Emulsionen aus Freundschem Adjuvans oral appliziert wurden, sind meines Wissens in der internationalen Literatur bisher nicht beschrieben worden. Dementsprechend gibt es auch keine Hinweise auf geeignete Werte für Dosierung, Impfrhythmus und allgemeinen Aufbau der Versuche. Um von einem festen Bezugspunkt auszugehen, sollte zunächst, an die oralen Immunisierungsversuche von RAETTIG (78) anknüpfend, den Mäusen an zweimal 5 Tagen 1o Einzeldosen von o,25 ml einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans bzw. inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium--Bakterien (Keimzahl $1o^9$/ml) oral mit der Schlundsonde gegeben werden. In der Gesamtdosis von 2,5 ml Emulsion pro Maus befanden sich 1,25 ml Freundsches Adjuvans. Diese Menge entsprach etwa 8 % des Körpergewichtes der Versuchstiere.

Anordnung und Verlauf des Versuches bis zum Infektionstag

Versuchsgruppen 1 und 2

Um eine unspezifische Schädigung der Tiere bei der Verabfolgung der Wasser-in-Öl-Emulsion durch diese nicht unerheblichen Mengen an Mineralöl auszuschließen, wurde in den Versuchsgruppen 1 und 2 zunächst die Verträglichkeit von 1o Einzeldosen von je o,25 ml kompletten Freundschen Adjuvans geprüft. Bereits unmittelbar nach der oralen Gabe des Öls zeigten einige Tiere Symptome einer starken vegetativen Beeinträchtigung. Sie zitterten und waren für 2o bis 3o Minuten schweißnaß.

Vom zweiten Versuchstag an hatten alle Tiere eine starke Diarrhoe. Am vierten Versuchstag, d.h. nach drei oralen Ölgaben, waren bereits etwa 4o % verstorben. Da nach einer vierten Applikation sicherlich auch die restlichen Versuchstiere eingegangen wären, wurde kein weiteres Mineralöl mehr gegeben. Von den überlebenden Mäusen verstarb bis zum Tag der Infektion keine mehr.

Versuchsgruppen 3 und 4

Alle Mäuse dieser Versuchsgruppen, welche dreimal o,1 ml komplettes bzw. inkomplettes Freundsches Adjuvans eigener Herstellung subkutan unter die Rückenhaut injiziert bekommen hatten, zeigten etwa 8 bis 1o Tage nach der letzten Injektion Zwei- bis Fünf-Pfennigstück große und erhabene subkutane Abszesse. Über den Abszessen verdünnte sich die Haut und das Fell ging völlig aus. Die Eiterungen brachen jedoch nicht nach außen durch. Bei der Eröffnung zeigten sich tiefe Nekrosehöhlen, welche mit körnigem Eiter gefüllt waren. Bei allen untersuchten Tieren war der Eiter steril.

Versuchsgruppe 5

Den Tieren dieser Versuchsgruppe war dreimal o,1 ml komplettes Freundsches Adjuvans der Firma Difco unter die Rückenhaut injiziert worden. Diese Tiere bekamen keine Abszesse.

Versuchsgruppe 6

25 Mäuse blieben als Kontrolltiere unbehandelt.
Aufbau und Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt.

Versuchsgruppen à 25 Mäuse	Art der Gabe	Testsubstanzen	Einzeldosis in ml	Gesamtdosis in ml
1	3 X oral	Kompl. Adjuvans - eigene Mischung	0,25	0,75
2	3 X oral	Inkompl. Adjuvans -eigene Mischung	0,25	0,75
3	3 X sc.	Kompl. Adjuvans -eigene Mischung	0,1	0,3
4	3 X sc.	Inkompl. Adjuvans -eigene Mischung	0,1	0,3
5	3 X sc.	Kompl. Adjuvans-Difco	0,1	0,3
6	-	Negative Kontrolle	-	-

Tab.2 Aufbau des Versuch II

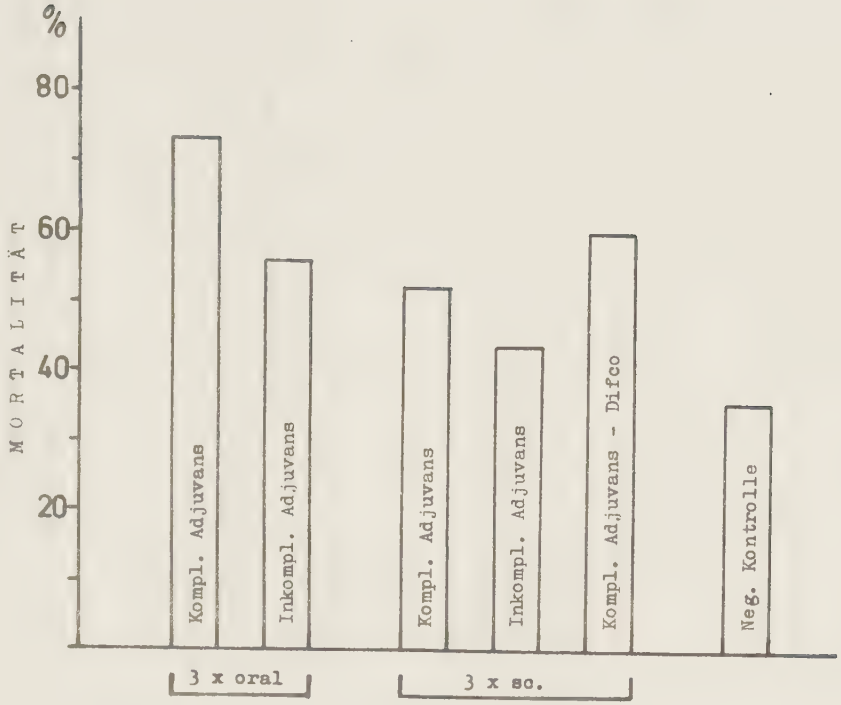

Tabelle 3

Endmortalität in den mit kompl. und inkompl. Adjuvans oral und subcutan vorbehandelten Versuchsgruppen. Die Endmortalität wurde auf die Zahl der am Infektionstag noch lebenden Tiere berechnet.

Versuchsergebnis

Wie die Endmortalität zeigt, hat die Vorbehandlung mit Freundschem Adjuvans alle Versuchstiere geschädigt. Nicht unerwartet ist diese Schädigung am stärksten bei den oral vorbehandelten Gruppen 1 und 2, deren Tiere zu etwa 4o % bereits während der ersten Versuchstage eingegangen waren. Weniger deutlich ist die Beeinträchtigung bei den Gruppen 3 und 4 mit subkutaner Applikationsweise des Adjuvans, doch liegt auch hier die Endmortalität deutlich über derjenigen der unbehandelten Kontrollgruppe 6. Es fällt weiter auf, daß die Endmortalität in der Gruppe 5 (komplettes Freundsches Adjuvans der Firma Difco: keine Abszesse) erheblich höher liegt als in den Gruppen 3 und 4 (selbst gemischtes komplettes Adjuvans: massive sterile Abszesse). Bei der Ausdehnung und Schwere der Abszedierung wäre eher ein umgekehrtes Verhalten zu erwarten gewesen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Erfahrung, daß die immunologische Antwort bei subkutaner Anwendung einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus Freundschem Adjuvans besonders deutlich ist, wenn sich am Injektionsort sterile Abszesse entwickeln.

Bemerkenswert ist weiter, daß sowohl bei subkutaner als auch bei oraler Anwendung die Endmortalität der mit komplettem Adjuvans vorbehandelten Tiere über derjenigen der mit inkomplettem Adjuvans behandelten liegt.

Versuch II. Versuchsgruppen 7 bis 1o

Versuchsaufbau

Wie oben ausführlich dargestellt wurde, erweist sich das Freundsche Adjuvans bei oraler Gabe in der Dosierung von 1o x o,25 ml für die Versuchstiere als toxisch. In den folgenden Versuchsgruppen soll die orale Verträglichkeit des kompletten Freundschen Adjuvans bei Erniedrigung der Einzeldosis von o,25 ml auf o,o2 ml geprüft werden.
Es erhielten die Mäuse
der Versuchsgruppe 7 1o Einzeldosen
der Versuchsgruppe 8 3 Einzeldosen
der Versuchsgruppe 9 1 Einzeldosis
von o,o2 ml komplettem Freundschen Adjuvans der Firma Difco oral. Die Tiere der Versuchsgruppe 1o blieben als Kontrollen unbehandelt. Bis zum Infektionstag zeigte keines der Versuchstiere Symptome einer Erkrankung oder verstarb.

Versuchsergebnis

Die Endmortalität am 25. Versuchstag lag bei allen Versuchsgruppen zwischen 6o und 7o %. Zu einer nachweislichen Schädigung der mit dem Freundschen Adjuvans vorbehandelten Tiere ist es bei den hier gewählten Dosen - im Gegensatz zu den Versuchsgruppen 1 bis 6 - also nicht gekommen.

Zusammenfassend kann aus dem Versuch II gefolgert werden, daß bei oraler Gabe die ursprünglich geplante Gesamtdosis von 1o x o,25 ml Adjuvans / Maus nicht beibehalten werden kann, ohne eine Vorschädigung der Versuchstiere zu erzeugen. Dagegen zeigen Einzeldosen von o,o2 ml und Gesamtdosen bis zu o,2 ml / Maus keine toxische Wirkung.
Aus diesem Grunde wurden für alle folgenden Versuche Einzeldosen in der Größenordnung von 1/1oo ml und Gesamtdosen in der Größenordnung von 1/1o ml gewählt.

Versuch III

Bestimmung einer optimalen Dosierung einer Wasser-in-Öl--Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium.

Versuchsanordnung

Den je 5o Mäusen der Versuchsgruppen 1 bis 5 wurde an zweimal 5 Tagen 1o mal oral eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien (Keimzahl 2 x $1o^{1o}$/ml) in folgenden Einzeldosen gegeben:

VG 1: o,o2 ml,
VG 2: o,o5 ml,
VG 3: o,1 ml,
VG 4: o,15 ml,
VG 5: o,2o ml.

5o Mäuse erhielten als positive Kontrollgruppe 6 im gleichen Rhythmus 1o mal o,25 ml einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien (Keimzahl 2 x $1o^{9}$/ml) verabreicht. 5o Mäuse blieben als Negativkontrolle 7 unbehandelt.

Versuchsverlauf bis zur Infektion

Keines der Versuchstiere zeigte Symptome einer Diarrhoe oder einer anderen Erkrankung. Es fiel jedoch auf, daß in den Versuchsgruppen mit der höchsten Dosierung, nämlich in den Versuchsgruppen 4 und 5, vier bzw. sieben Mäuse einen mehr oder weniger starken Ausfall des Rückenfelles aufwiesen. Bei drei Tieren waren die verdünnten Stellen fast 1o-Pfennigstück groß und auffallend scharf begrenzt. Der Haarausfall war am deutlichsten zwischen dem 9. und 13. Versuchstag, d.h. zu Ende der Immunisierungsperiode zu beobachten. Später

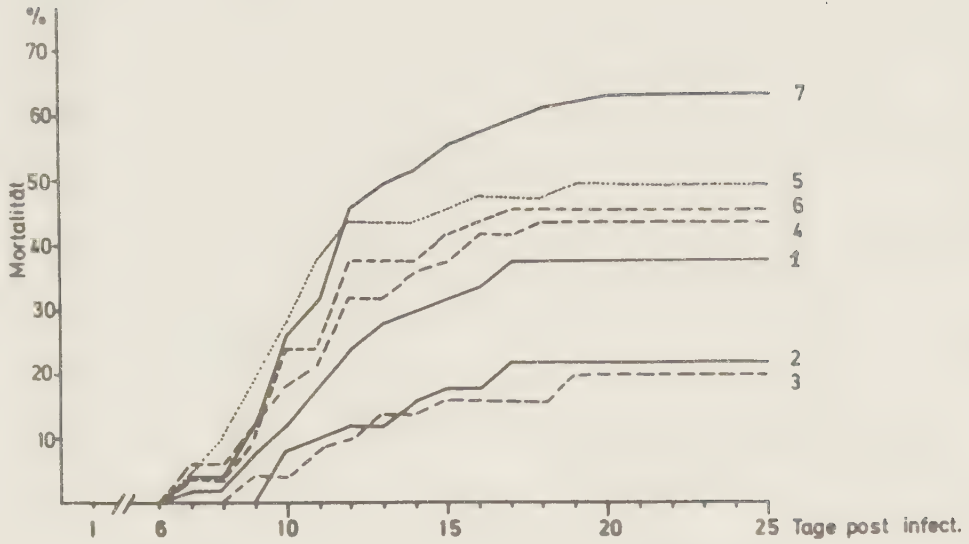

Abb. 2 Versuch III. Anstieg der Mortalität nach oraler Infektion mit S.t.m.-Bakterien in den mit steigenden Dosen einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Versuchsgruppen 1 bis 6 und der unbehandelten negativen Kontrollgruppe 7.

wuchs das Fell wieder nach.

Versuchsergebnis

Wie aus der Abbildung 2 hervorgeht, beträgt die Endmortalität der unbehandelten negativen Kontrollgruppe 7 68 %. Die zugehörige Mortalitätskurve verläuft - von der noch zu diskutierenden Überschneidung durch die Kurven der Versuchsgruppen 4 und 5 in ihrem Anfangsbereich abgesehen - oberhalb der Mortalitätskurven der oral vorbehandelten Gruppen 1 bis 6. Durch orale Immunisierung mit hitzeinaktivierten S. typhimurium-Bakterien in wässriger Suspension (Gesamtkeimzahl: $2{,}5 \times 10^9$) wird die Endmortalität auf 48 % gesenkt (VG 6). Durch Gabe einer gleichgroßen Antigenmenge in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion wird der Impferfolg weiter verbessert (VG 1). Bei einer Erhöhung dieser Gesamtdosis um den Faktor 2,5 (1o x o,o5 ml Emulsion) sinkt die Mortalität erneut (VG 2). Nach der Gabe der fünffachen Ausgangsdosis (1o x o,1 ml Emulsion) erreichte der Impfschutz bei einer Endmortalität von 2o % optimale Werte (VG 3). Es fällt jedoch auf, daß der Abstand zur Kurve der Versuchsgruppe 2 und damit die Verbesserung des Impfschutzes trotz Verdopplung der Dosis nur noch minimal ist. Bei einer weiteren Erhöhung der Ausgangsdosis um den Faktor 7,5 (1o x o,15 ml Emulsion) kehrt sich die den Impfschutz steigernde Wirkung um: Die Mortalitätskurve der Gruppe 4 verläuft in ihrem gesamten Bereich über derjenigen der Gruppe 1. Bei der Gabe der 1o-fachen Gesamtdosis (1o x o,2 ml Emulsion) steigt die Mortalität erneut an (VG 5).

In ihrem Anfangsbereich verlaufen die Kurven der Versuchsgruppen 4 und 5 oberhalb derjenigen der Versuchsgruppe 7. Das bedeutet, die Mortalität in den mit den höchsten Dosen Emulsion vorbehandelten Gruppen ist zeitweilig höher als die in der negativen Kontrollgruppe. Besonders deutlich wird dieser Sachverhalt in der Abbildung 4, in welcher der relative Impfschutz als Abstand der jeweiligen Mortalitätskurven

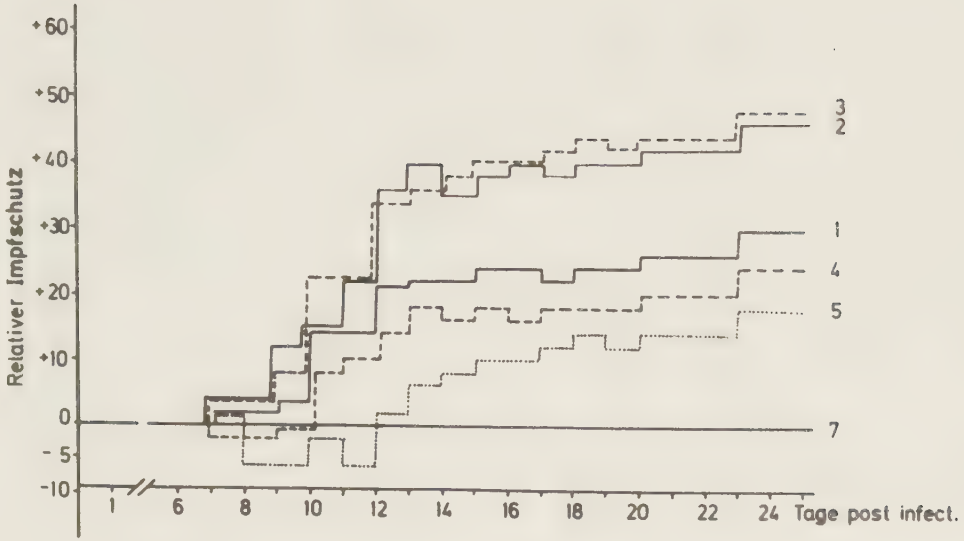

Abb. 3 Versuch III. Relativer Impfschutz nach oraler Immunisierung mit steigenden Dosen einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen. Der relative Impfschutz ergibt sich aus den Abständen der jeweiligen Mortalitätskurven der Gruppen 1 bis 6 zur Mortalitätskurve der unbehandelten Kontrollgruppe 7, die hier als Null-Linie aufgetragen ist. Erhöhter Impfschutz ist auf der Ordinate nach oben, erniedrigter nach unten aufgetragen.

von derjenigen der unbehandelten Kontrollgruppe 7 aufgetragen ist. Wie oben beschrieben, nimmt der Impfschutz mit steigender Dosis zunächst zu, um dann unter die Ausgangswerte der Gruppe 1 zu sinken. Die erhöhte Frühsterblichkeit ist bei der Gruppe 4 als kleine und bei der Gruppe 5 als größere negative " Vorschwankung " zu erkennen. Der zeitlichen Zuordnung entsprechend handelt es sich um eine erhöhte Sterblichkeit innerhalb des Verlaufes der zyklischen Infektionskrankheit. Damit wird deutlich, daß diese Sterblichkeit nicht identisch mit der von RAETTIG (78) beschriebenen Frühmortalität ist. Jene tritt innerhalb der Inkubationszeit auf und wird mit dem septischen Ausgang der Resorptionsbakteriämie in Zusammenhang gebracht.

Es ist naheliegend, die hier beobachtete Frühmortalität auf eine toxische Wirkung des Freundschen Adjuvans zurückzuführen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung verstärkt, daß die Frühmortalität nur in den Gruppen mit der höchsten Dosierung auftritt und einige dieser Versuchstiere bereits während der Zeit der Immunisierung Zeichen einer schädigenden Beeinflussung in Form von Haarausfall aufwiesen. Dafür spricht auch, daß sich diese Tiere nach Beendigung der Immunisierungsphase zunächst erholten. Die grundsätzliche Beeinträchtigung wird jedoch in der erhöhten Endmortalität sichtbar.

Als schädigende Noxe kann theoretisch neben dem Freundschen Adjuvans auch das Antigen wirksam sein. Nach bisher noch nicht veröffentlichten Versuchen von RAETTIG (persönliche Mitteilung) zeigen jedoch Mäuse selbst nach Gesamtdosen in der Größenordnung von $1o^{12}$ Keimen keine nachweisbare Beeinträchtigung. Als Ursache der Vorschädigung muß also das Freundsche Adjuvans angesehen werden.

Versuch IV

Veränderung von Impfrhythmus und Gesamtdosis der Emulsion bei konstanter Antigenmenge.

Der Versuchsaufbau ist in der Tabelle 4 zusammengefaßt. Wie aus der Tabelle hervorgeht, blieben folgende Faktoren bei allen Versuchsgruppen (mit Ausnahme der negativen Kontrollgruppe 5) konstant:

1. Einzeldosis ED = o,o5 ml Emulsion bzw. Suspension
2. Gesamtkeimzahl GKZ = 5 x $1o^9$ Keime / Maus

Folgende Faktoren wurden variiert:

1. Der Impfrhythmus und die Zahl der Impfstoffgaben (2 mal, 5 mal, 1o mal)
2. Die Gesamtdosis der Emulsion (o,1 ml, o,25 ml, o,5 ml)
3. Die Gesamtdosis der in der Emulsion enthaltenen Menge an Freundschem Adjuvans. (o,o5 ml, o,125 ml, o,25 ml)

Die Infektion erfolgt wie üblich am 1o. Tag nach der letzten oralen Immunisierung.

Versuchsergebnis

Wie die Abbildung 4 zeigt, beträgt die Endmortalität in der negativen Kontrollgruppe 5 64 %. Nach oraler Immunisierung mit hitzeinaktivierten S. typhi murium-Bakterien in wässriger Suspension sinkt die Mortalität in der positiven Kontrollgruppe 4 auf 44 %. Der Impfschutz in den Gruppen 1 und 3 ist mit je 52 % Endmortalität schlechter als in der positiven Kontrollgruppe 4. Der Impfschutz in der Gruppe 2 ist bei einer Endmortalität von 36 % dagegen besser. Da die verabreichten Antigenmengen in allen Gruppen identisch sind, liegt es nahe,

Versuch IV

Versuch	1	2	3	4	5
Zahl der Tiere	25	25	25	25	25
Testsubstanzen	Wasser-in-Öl-Emulsion kompl.Adj.+ wässrig.Susp. v. S.t.m.	" " "

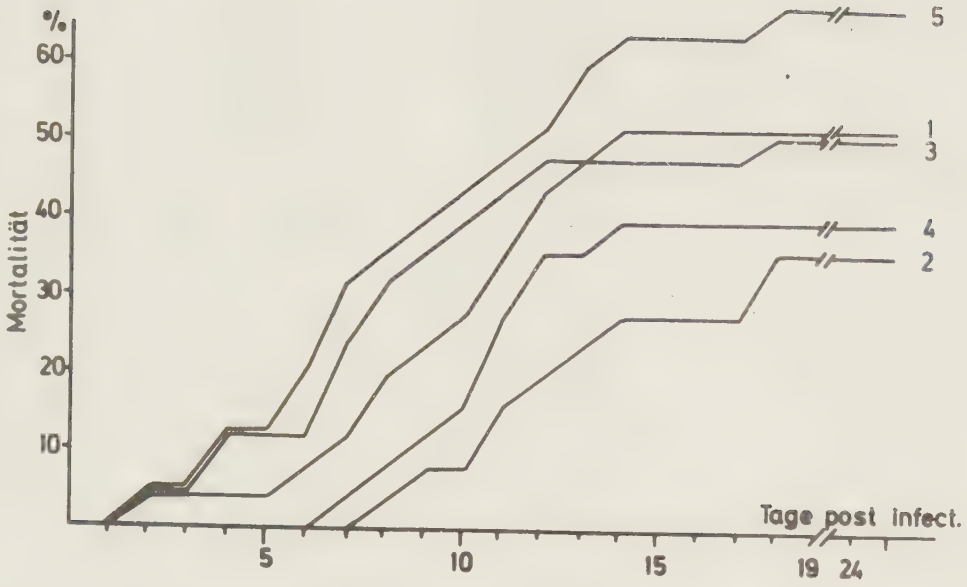

Abb. 4 Versuch IV. Mortalität post infect. bei Versuchsgruppen, welche in unterschiedlichem Rhythmus und mit verschieden großen Emulsionsgesamtdosen bei identischen Antigengesamtdosen oral immunisiert wurden. - Einzelheiten des Versuchsaufbaues sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

diesen Versuchsausgang durch die Wirkung des Freundschen Adjuvans einerseits und die Variation des Impfrhythmus andererseits zu erklären. Die Gruppe 1 hat den günstigsten Impfrhythmus (1o mal oral) und die höchste Gesamtdosis an Freundschem Adjuvans (o,25 ml/Maus). Die Gruppe 3 hat den ungünstigsten Impfrhythmus (2 mal oral) und die niedrigste Gesamtdosis Freundsches Adjuvans (o,o5 ml/Maus). Der vergleichsweise schlechte Impferfolg wird demnach in Gruppe 3 eine Folge des ungünstigen Impfrhythmus, in Gruppe 1 eine Beeinträchtigung durch das Freundsche Adjuvans sein. In Gruppe 2 addieren sich die Wirkung eines günstigen Impfrhythmus und einer niedrigen Dosis Adjuvans: der Impferfolg ist optimal.

Der Versuchsausgang steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorhergehenden Untersuchungen. Durch das komplette Freundsche Adjuvans scheint sich der Impfschutz bei der oralen Immunisierung unter bestimmten Umständen verbessern zu lassen. Jedoch liegen möglicherweise eine fördernde und eine schädigende Wirkung sehr nahe beieinander.

Aufgrund der Ergebnisse der Versuche II, III und IV wurde für den Hauptversuch folgende Dosierung gewählt:

1o mal o,o2 ml Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem oder inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien mit einer Keimzahl von $1 \times 1o^{1o}$/ml.

Versuch V

Einfluß des Sättigungszustandes der Versuchstiere auf die Wirkung einer oral gegebenen Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien.

Versuchsanordnung

Versuchsgruppen 1 und 2

Jede der beiden Versuchsgruppen bestand aus 5o Mäusen, denen 1o x o,o2 ml einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer Suspension von S. typhi murium-Bakterien (Keimzahl = 1 x $1o^{1o}$/ml) oral mit der Schlundsonde gegeben wurde.

Versuchsgruppe 1: Den Mäusen wurde jeweils am Vorabend das Trockenfutter weggenommen und erst 45 Minuten nach der am kommenden Vormittag verabfolgten Gabe der Emulsion wieder zurückgegeben. Hungerpause bis zur oralen Gabe : etwa 17 Stunden. Hungerpause nach der oralen Gabe: etwa 45 Minuten.

Versuchsgruppe 2: Den Mäusen wurde jeweils am Vorabend das Trockenfutter weggenommen, jedoch am kommenden Vormittag etwa 3o Minuten vor der oralen Gabe der Emulsion wieder zurückgegeben. In dieser Zeitspanne hatten alle Versuchstiere ausgiebig gefressen, so daß angenommen werden konnte, daß die orale Gabe der Emulsion in eine Phase gesteigerter Verdauungs- und Resorptionstätigkeit fiel.

Versuchsgruppe 3

5o Mäuse erhielten als positive Kontrollgruppe 1o x o,o2 ml einer wässrigen Suspension von S. typhi murium (Keimzahl = 5 x $1o^9$/ml). Der Fütterungsrhythmus war der gleiche wie bei der Gruppe 2

Die oral applizierte Gesamtkeimzahl / Maus ist in den Versuchsgruppen 1, 2 und 3 gleich groß und beträgt 1 x $1o^9$ Keime.

Versuchsgruppe 4

5o Mäuse blieben als Kontrollgruppe unbehandelt, wurden jedoch im gleichen Rhythmus gefüttert.

Die Tiere aller 4 Versuchsgruppen entwickelten sich gut und zeigten keinerlei krankhafte Veränderungen. Zwischen den Versuchstieren der einzelnen Gruppen ließen sich keine Unterschiede in bezug auf Größe, Gewicht oder Gesundheitszustand feststellen. - Die Infektion erfolgte wie üblich am 1o. Tag nach der letzten oralen Immunisierung.

Versuchsergebnis

Wie aus der Abbildung 5 ersichtlich wird, verlaufen die Mortalitätskurven der ersten und zweiten Versuchsgruppe fast identisch. Eine Beeinflussung der oralen Immunisierungsvorgänge durch den unterschiedlichen Sättigungszustand der Tiere läßt sich somit nicht nachweisen. Ob diese Aussage lediglich das Ergebnis der hier gewählten Versuchsbedingungen ist, oder ob ihr grundsätzliche Bedeutung zukommt, kann im Rahmen dieses Versuches nicht beantwortet werden.

Das Versuchsergebnis läßt andererseits jedoch die Aussage zu, daß der individuelle Sättigungsgrad der Versuchstiere zum Zeitpunkt der oralen Immunisierung offensichtlich ohne Einfluß auf den Immunisierungserfolg ist und in den Versuchen deshalb nicht berücksichtigt zu werden braucht.

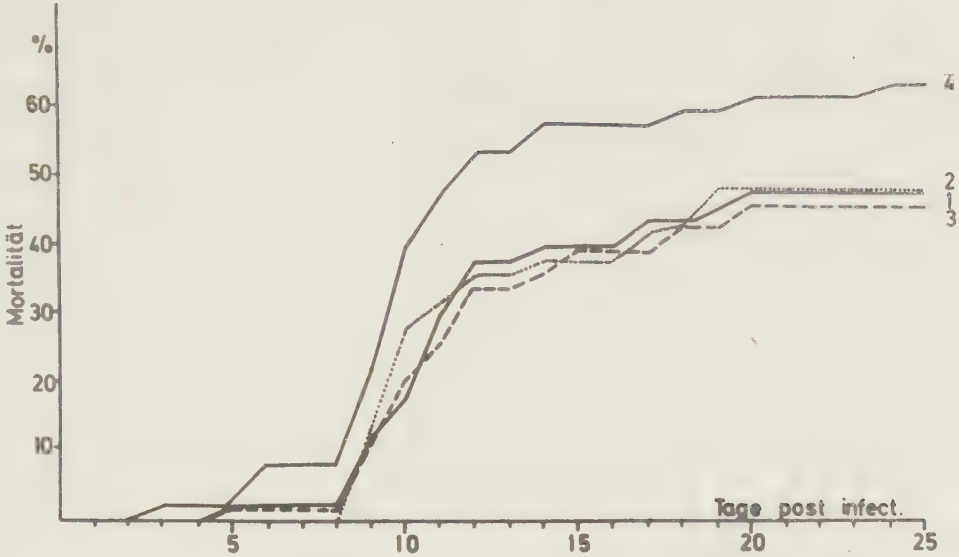

Abb. 5 Versuch V. Mortalität post infect. in den mit einer W-i-Ö-Emulsion aus inkompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.--Antigen oral immunisierten Versuchsgruppen 1 und 2. Die Tiere der VG 1 wurden jeweils nach einer Hungerpause von 17 Stunden, die Tiere der VG 2 jeweils im satten Zustand immunisiert. Zum Vergleich die Mortalität der positiven Kontrollgruppe 3 und der negativen Kontrollgruppe 4, welche keiner besonderen Fütterungsrhythmik unterlagen.

Bemerkenswerter als der beinahe identische Verlauf der Kurven der Versuchsgruppen 1 und 2 erscheint ihr nur geringer Abstand zur Kurve der positiven Kontrollgruppe 3. Da die Versuchstiere aller drei Gruppen gleich große Antigenmengen erhalten hatten, wäre bei einer zusätzlichen Steigerung des Impferfolges durch das inkomplette Freundsche Adjuvans ein deutlicher Abstand der Kurven der Gruppen 1 und 2 zu der der positiven Kontrollgruppe 3 zu erwarten gewesen. Alle drei Kurven verlaufen aber sehr dicht beieinander. Das bedeutet, daß sich die Kurven der mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans vorbehandelten Gruppen wie diejenigen von positiven Kontrollgruppen verhalten. Die erreichte Endmortalität von 46 % entspricht übrigens fast dem für die positiven Kontrollgruppen des Hauptversuches errechneten Mittelwert. Eine potenzierende Wirkung des inkompletten Adjuvans auf das spezifische Antigen oder eine unspezifische Steigerung der Resistenzlage besteht also nicht.

Wie noch an anderer Stelle ausführlich dargestellt wird, erwies sich auch in den weiteren Versuchen das inkomplette Freundsche Adjuvans bei oraler Gabe im Sinne eines Adjuvans völlig wirkungslos.

Versuch VI

Untersuchungen zur Resorptions- und Infektionsbakteriämie.

Versuchsaufbau

Jede der zwei Versuchsgruppen A und B umfaßte 1oo Mäuse, welche etwa drei Monate alt und schwerer als 28 Gramm waren. Durch die Wahl von verhältnismäßig großen Tieren sollte der Blutverlust in bezug auf das Gesamtblutvolumen möglichst niedrig gehalten werden, um die schwer abzugrenzende Schwächung der Tiere durch eine Anaemie nicht in den Versuchsablauf eingehen zu lassen. An jedem Versuchstag wurden je 1o Mäuse beider Versuchsgruppen synchron mit je o,125 ml einer virulenten Kultur von S. typhi murium-Bakterien (Keimzahl etwa $1 \times 1o^9$/ml) oral infiziert. Die Tiere der Gruppe A erhielten die Infektionsdosis in Form einer wässrigen Suspension (Verdünnung 1 : 1), die Tiere der Gruppe B in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans. Die verabreichten Volumina der Suspension und der Emulsion betrugen damit jeweils o,25 ml. Danach wurde jeder Maus entsprechend dem in der Abbildung 6 angegebenen Rhythmus unter sterilen Bedingungen Blut aus den Schwanzgefäßen entnommen. Der Mäuseschwanz wurde dazu mit 6o %-igem Isopropylalkohol abgespült und mit sterilem Zellstoff trocken gewischt. Sodann wurde mit einer sterilen Schere die Schwanzspitze abgeschnitten und der austretende Blutstropfen mit einer Blutzuckerpipette bis zur Marke o,o1 ml aufgezogen und in 2,o ml Selenitbrühe ausgeblasen. Alle weiteren Blutentnahmen erfolgten in derselben Weise, d.h. der Schwanzstumpf wurde bei jeder weiteren Entnahme erneut beschnitten. Durch schnelles und sauberes Arbeiten konnten Verunreinigungen vermieden werden. Aus der Selenitkultur wurde nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C o,4 ml Flüssigkeit auf Endoagar ausplattiert und nach

weiterer 24-stündiger Bebrütung auf gewachsene Salmonellenkolonien untersucht. Da in der Regel höchstens eine Kolonie gewachsen war, wurde nur zwischen positiv und negativ unterschieden.

Versuchsergebnis

In der Abbildung 6 sind die Ergebnisse des Versuches zusammengestellt. Die mit arabischen Ziffern bezeichneten Kurven gehören zu der Gruppe A, deren 1oo Versuchstiere mit einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien infiziert wurden. Bereits 15 Minuten nach der oralen Infektion sind bei 28 % der Tiere Salmonellen im strömenden Blut nachweisbar. Die Kurve erreicht nach 3o Minuten mit 38 % ihr Maximum, um dann zunächst sehr schnell und später langsamer abzufallen. Am dritten Tage post inf. liegt der Gipfel eines zweiten Kurvenanstieges. Das Gesamtbild zeigt den typischen zweiphasigen Bakteriämieverlauf nach oraler Gabe von virulenten Erregern, wobei der erste sehr schlanke Gipfel der Resorptionsbakteriämie und der zweite breite Anstieg der Infektionsbakteriämie entspricht (RAETTIG, 82). In der Abbildung 7 habe ich den Verlauf der Resorptionsbakteriämie noch einmal gesondert dargestellt. Erstaunlich ist die weitgehende Übereinstimmung mit der von RAETTIG (82) für Viren aufgestellten Normkurve. Abweichend davon ist lediglich der schnelle Abstieg nach Erreichen des Gipfels. Das Absinken der Kurve wird damit erklärt, daß (bei nicht immunisierten Tieren) die in die Blutbahn gelangten Erreger durch unspezifische Abwehrvorgänge eliminiert werden. Es ist gut vorstellbar, daß die Kurve in diesem Bereich dann nicht linear, sondern im Sinne einer Exponentialfunktion verläuft, wenn zusätzliche spezifische Mechanismen zur Wirkung kommen. Wie schon früher erwähnt, werden Mäuse erfahrungsgemäß mit steigendem Lebensalter gegenüber einer Infektion mit S. typhi murium-Bakterien zunehmend resistenter. Diese Erscheinung beruht wahrscheinlich

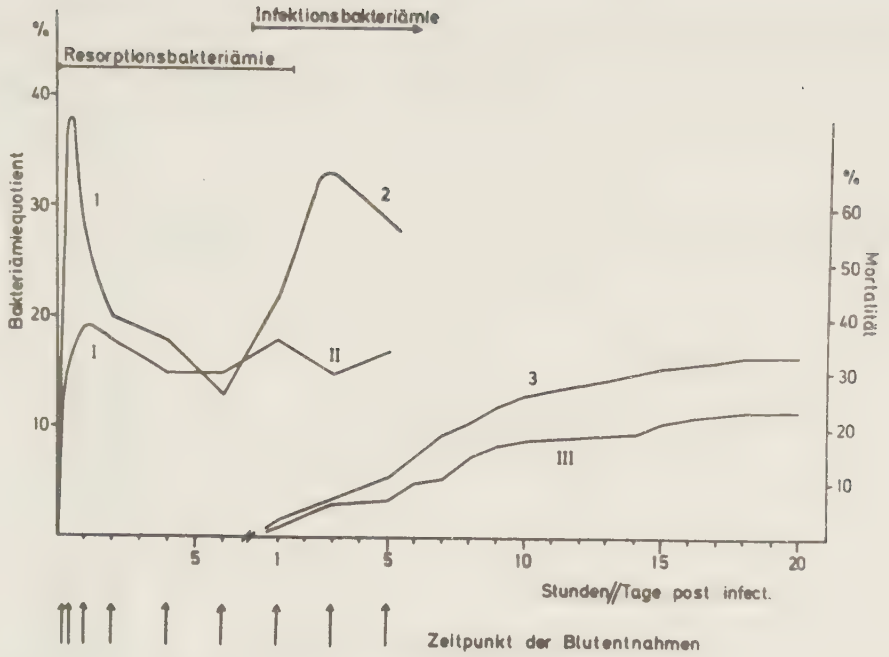

Abb. 6 Versuch VI. Resorptions- und Infektionsbakteriämie sowie Mortalitätsverlauf nach oraler Gabe von S.t.m.-Bakterien in Form einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans (Kurven mit römischen Ziffern) sowie einer einfachen wässrigen Suspension (Kurven mit arabischen Ziffern).

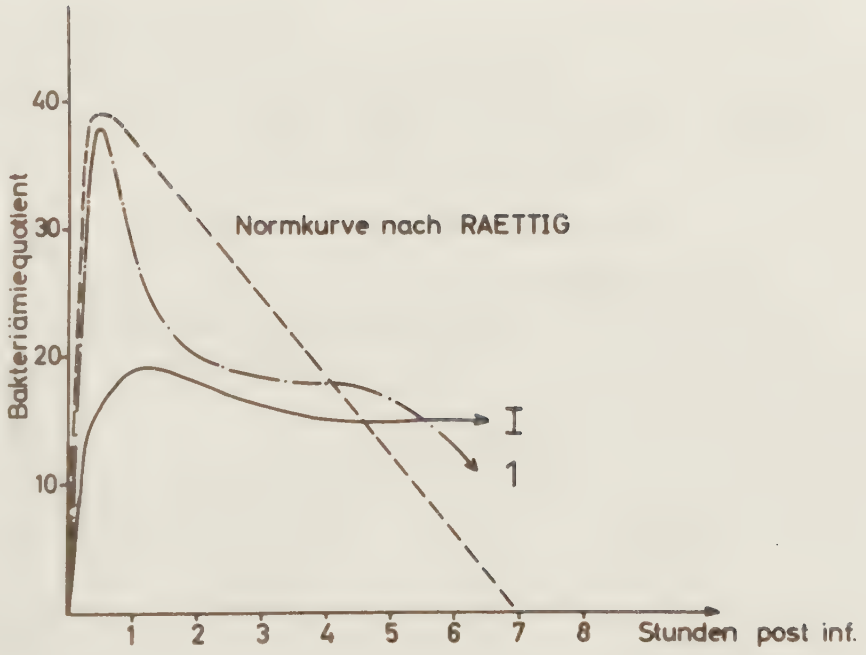

Abb. 7 Versuch VI. Resorptionsbakteriämie nach oraler Gabe von virulenten S.t.m.--Bakterien in Form einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans (Kurve I) sowie in Form einer einfachen wässrigen Suspension (Kurve 1). Zum Vergleich die von RAETTIG für die Resorption von Viren aufgestellte Normkurve.

auf einer gegen ein gemeinsames Enterobakt.-Antigen erworbenen Grundimmunität. Da in dem Versuch VI ältere Tiere benutzt wurden, kann das schnelle Verschwinden der Bakterien aus dem strömenden Blut in dieser Hinsicht gedeutet werden. Zur endgültigen Beantwortung müßte diese für die orale Immunisierung bedeutungsvolle Frage an einem größeren Tiermaterial geprüft werden.

Die Kurven der Versuchsgruppen B sind mit römischen Zahlen gekennzeichnet. In diesem Fall waren die 1oo Versuchstiere mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium--Bakterien infiziert worden. Wie besonders aus der Abbildung 6 hervorgeht, hat diese Anwendungsform den Resorptionsablauf qualitativ und quantitativ erheblich verändert. Der Kurvenanstieg erfolgt vergleichsweise langsam. Das Resorptionsmaximum wird erst nach einer Stunde erreicht und entspricht mit 19 % quantitativ gerade der Hälfte des entsprechenden Wertes der Gruppe A (nach 3o Minuten). Dafür fällt der Bakteriämiequotient in den folgenden drei Stunden mit 4 % nur unwesentlich ab. Er scheint für längere Zeit ein Plateau zu bilden. Es ist möglich, daß der nach 24 Stunden gefundene Wert ganz oder teilweise noch zur Resorptionskurve gehört. Wie schon erwähnt, findet man nach oraler Verabreichung von pathogenen und apathogenen Viren (RAETTIG, 81, 82), Bakterien (siehe Versuchsgruppe A), sowie von Pilzen (FUNK, 38) außerordentlich ähnliche Resorptionsbilder. Daraus kann auf sehr gleichförmige Vorgänge bei der Aufnahme der Erreger geschlossen werden. Die Resorptionsbakteriämiekurve der Gruppe B paßt nicht in diesen Rahmen. Sie wird am ehesten verständlich, wenn man annimmt, daß aus einem Depot ziemlich gleichmäßig über viele Stunden Bakterien zur Resorption freigegeben werden. Es liegt nahe, als dieses Depot die Mineralölemulsion anzunehmen. Die Resorptionsleistung wird jedoch nicht nur verzögert, sondern auch quantitativ erheblich redu-

ziert, wie aus der Erniedrigung der Kurven der Infektionsbakteriämie und der Mortalität zu ersehen ist. Beide Parameter sind - wie RAETTIG (82) zeigen konnte - stark dosisabhängig. Da die oral verabreichte Infektionsdosis bei den Gruppen A und B identisch war, stellen die Infektionsbakteriämie und die Mortalität in diesem besonderen Fall einen Maßstab für die Resorption bzw. die Verminderung der Resorption auf Grund der besonderen Applikationsform dar.

Ich verweise auf die Diskussion.

Versuch VII

Wirkung einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus Olivenöl und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien.

Nach den Angaben von FREUND (37) hat das nach ihm benannte Adjuvans nur dann eine potenzierende Wirkung, wenn die Ölphase aus einem Mineralöl besteht. Pflanzenöle sollen als Adjuvans grundsätzlich wirkungslos sein. Abgesehen davon, daß FREUND (35, 36) ursprünglich gegensätzliche Versuchsergebnisse veröffentlicht hatte, ist diese Auffassung nicht unwidersprochen geblieben. In dem Versuch VII soll geklärt werden, ob die von Freund für die parenterale Anwendung gemachten Aussagen auch bei oraler Gabe der Emulsion gelten. Es stellt sich somit die Frage, welcher Wirkungsunterschied besteht zwischen einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien und einer gleichartigen Emulsion, in der jedoch das Mineralöl Bayol F durch Olivenöl ersetzt ist.

Versuchsabschnitt A

Es wurden folgende Testsubstanzen verwendet:

1. eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien (Keimzahl = 1×10^{10}/ml).
2. eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus Olivenöl und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien gleicher Keimzahl.

Mit Ausnahme der unterschiedlichen Öle haben beide Emulsionen die gleiche Zusammensetzung und folgende Volumenverhältnisse: Öl: Emulgator: wässrige Antigensuspension = 1,5 : 1,0 : 10,0. Als Emulgator wurde in beiden Emulsionen Arlacel A verwendet.

Als Olivenöl wurde ein im Lebensmittelhandel gebräuchliches Markenöl, und zwar Olio Sasso der Firma P. Sasso e Figli / / Omeglia - Italia gewählt.

Die unter Verwendung von Olivenöl hergestellte Emulsion besaß eine wesentlich höhere Konsistenz (salbenartig) als die aus Freundschem Adjuvans hergestellte Emulsion (dickflüssig). Das Emulgieren im Spritzenemulgator war entsprechend mühevoll und nur unter erheblicher Kraftanwendung möglich.

Versuchsanordnung

Den 5o Mäusen der Versuchsgruppen 1, 2 und 3 wurde oral eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus Olivenöl und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien (Keimzahl = 1 x $1o^{1o}$/ml) gegeben, und zwar in folgender Dosierung:

Versuchsgruppe 1: 1o x o,o2 ml
Versuchsgruppe 2: 1o x o,o5 ml
Versuchsgruppe 3: 1o x o,1o ml
Versuchsgruppe 4: 5o Mäuse erhielten 1o x o,o2 ml einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien.
Versuchsgruppe 5: 5o Mäuse blieben als negative Kontrollgruppe unbehandelt.

Versuchsergebnis

Die Endmortalität der unbehandelten negatigen Kontrollgruppe 5 beträgt 66 %. Die Endmortalitätswerte der mit der Olivenölemulsion vorbehandelten Versuchsgruppen 1, 2 und 3 liegen mit 46 %, 42 % und 38 % dicht beieinander, wobei die stufenweise Erniedrigung der Mortalität der stufenweisen Erhöhung der Emulsionsdosis von o,2 ml über o,5 ml auf 1,o ml folgt. Die Endmortalität in der Versuchsgruppe 2, bei der jede Maus 2,5 x $1o^{9}$ Keime in Form der Olivenölemulsion erhalten hatte,

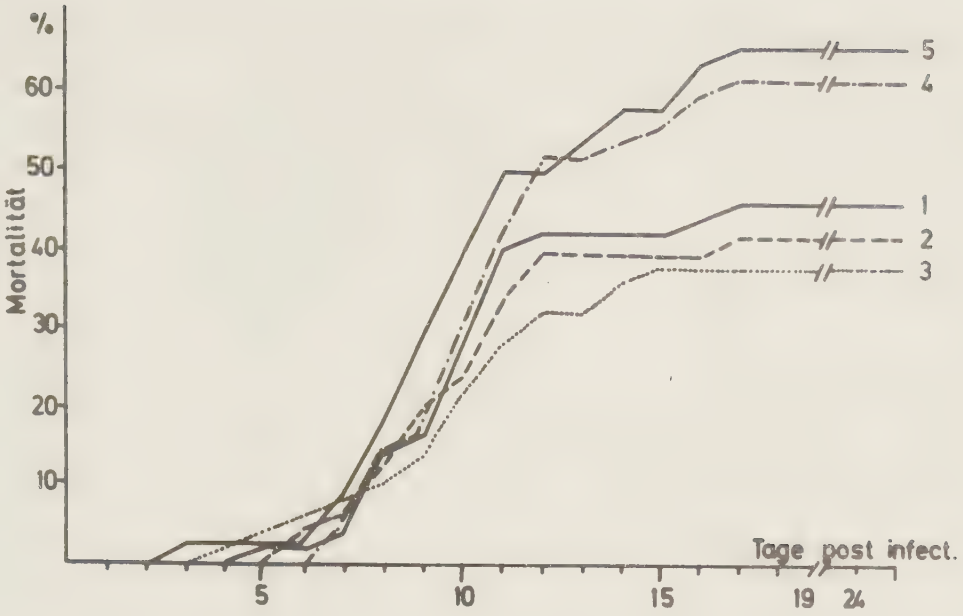

Abb. 8 Versuch VII A. Mortalität post infect. in den mit steigenden Dosen einer W-i-Ö-Emulsion aus Olivenöl und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Gruppen 1 bis 3, in der mit einer W-i-Ö-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Gruppe 4 sowie in der unbehandelten negativen Kontrollgruppe 5.

liegt mit 42 % nahe bei dem für die positiven Kontrollgruppen des Hauptversuches errechneten Mittelwert von 43,8 %. Bei jenen wurden 1,5 x 10^9 Keime als einfache wässrige Suspension oral gegeben. Die Versuchsgruppen 1, 2 und 3 verhalten sich also gleichartig wie positive Kontrollgruppen. Das bedeutet, daß die zugeführte Antigenmenge ihre Wirkung ohne nachweisliche positive oder negative Beeinflussung durch die besondere Applikationsform und die Gegenwart des Olivenöls entfaltet. Für eine potenzierende Wirkung der Wasser-in-Öl-Emulsion aus Olivenöl gibt es somit auf Grund dieses Versuchsergebnisses keine Anzeichen. Olivenöl verhält sich bei der hier gewählten Dosierung neutral und ist als Adjuvans völlig wirkungslos.

Ich verweise auf die Diskussion.

Versuchsabschnitt B

Die Aussagekraft des Versuchsabschnittes A wird durch die relativ geringe Zahl an Tieren in den einzelnen Versuchsgruppen eingeschränkt. Um die gefundenen Werte zu erhärten, wurden die Versuchsbedingungen der Gruppe 1 in zwei weiteren Ansätzen mit je 1oo Tieren wiederholt. Die aus allen drei Versuchsansätzen (als Versuchsgruppe 6 zusammengefaßt) resultierende Mortalitätskurve ist in der Abbildung 9 vergleichend mit denen der Gruppen C, E und F des Hauptversuches dargestellt. Die wichtigsten Daten über Aufbau und Ergebnisse des Versuches VII B sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Versuchsergebnis

Der Ausgang des Versuches bestätigt zunächst die Beobachtung, daß im Verhalten der mit der Olivenölemulsion immunisierten Versuchsgruppe 6 und der mit der wässrigen Suspension immunisierten positiven Kontrollgruppe E nur geringe Unterschiede bestehen. Diese bereits im Versuchsabschnitt A gemachte Beobachtung über den gleichartigen Verlauf der Mortalitätskurven

Versuch VII B

Versuch	6	C	E	F
Zahl der Tiere	249	445	575	719
Zahl der Ansätze	3	6	8	10
Testsubstanzen	Wasser-in-Öl-Emulsion Olivenöl + wässr. Susp. v. S.t.m.	Wasser-in-Öl-Emulsion inkompl.Adj.+ wässr. Susp.v. S.t.m.	Wässrige Suspension von S.t.m. (Positive Kontrolle)	(Negative Kontrolle)
Form der Gabe	------ 10 x oral-----			----
Einzeldosis in ml	------ 0,02 ----			----
Gesamtdosis in ml	------ 0,2 ----			----
Gesamtkeimzahl	------- 1,5x10^{9} ----			----
Zahl d.toten Tiere	104	235	251	470
Endmortalität in %	41,7	52,8	43,8	64,5
D_b	22.8	12,6	21,8	----
D_Z	9,8	7,9	7,8	----
E	2,3	1.6	3,0	----
Wirkungsindex	35.4	19.3	33,0	----
Mittl. Sterbetag	11.8	11.6	11,1	11,4

Tabelle 5

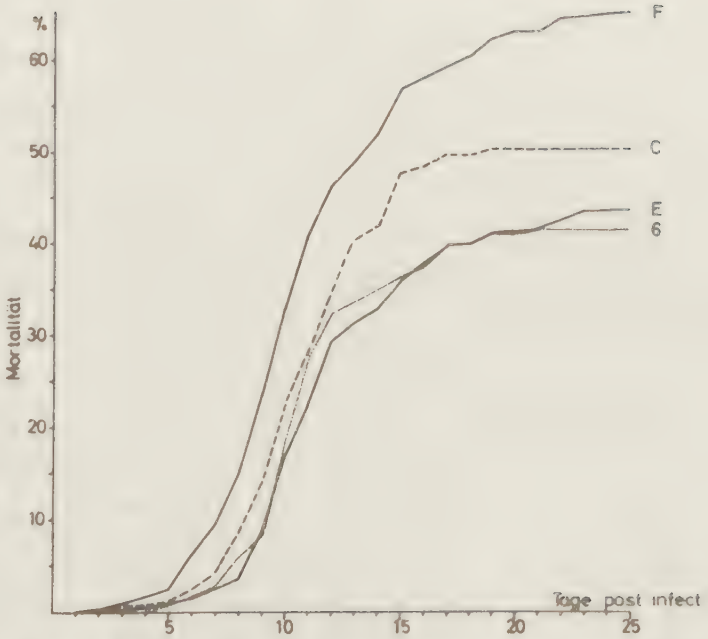

Abb. 9 Versuch VII B. Mortalität post infect. nach oraler Immunisierung mit einer W-i-Ö-Emulsion aus Olivenöl und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen, Versuchsgruppe 6. - Zum Vergleich die Mortalitätskurven der positiven Kontrollgruppe E, der negativen Kontrollgruppe F sowie diejenige der mit einer W-i-Ö-Emulsion aus inkompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Gruppe C des Hauptversuches.

dieser beiden Versuchsansätze wird verständlicher, wenn man die Aussagen des Versuches I berücksichtigt. Dieser bestätigte die Erfahrung, daß aus vegetabilen Ölen hergestellte Wasser-in-Öl-Emulsionen nur eine geringe Stabilität aufweisen. Auf Grund der raschen Spaltung im Magen-Darm-Kanal liegen die ölige und wässrige Phase der Emulsion höchst wahrscheinlich getrennt zur Resorption vor. Damit sind qualitativ und quantitativ dieselben Verhältnisse wie bei einer direkten Gabe der einfachen Suspension gegeben. Ein unterschiedlicher Immunisierungserfolg kann demnach auch nicht erwartet werden. Unter diesen Umständen ist ein echter Vergleich in bezug auf die Wirkung als Adjuvans zwischen Olivenöl und Mineralöl nicht möglich.

Weiterhin fällt auf, daß der durch die Mineralölemulsion erzeugte Impfschutz bei der Versuchsgruppe C überraschend schlecht ist. Es stellt sich somit die Frage, warum das inkomplette Adjuvans den Impferfolg nicht verbessert, sondern erheblich verschlechtert. Ich werde auf dieses Problem bei der Besprechung des Hauptversuches und in der Diskussion zurückkommen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß sich Olivenöl bei der hier gewählten Dosierung auf Grund der Instabilität der Emulsion bei der oralen Immunisierung völlig neutral verhält und als Adjuvans ohne Wirkung ist.

Versuch VIII. Hauptversuch.

Orale Immunisierung von weißen Mäusen mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem und inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien.

Der Hauptversuch besteht aus 6 Versuchsgruppen mit insgesamt 3137 Mäusen. Die Versuche wurden in Ansätzen von meist 5o oder 1oo Tieren in der Zeit zwischen April und Oktober 1969 parallel zueinander durchgeführt. Die positive und negative Kontrollgruppe faßt alle Versuchsansätze dieser Art zusammen und zwar auch solche, die organisationsmäßig zu den bereits oben beschriebenen Versuchen II bis VII gehören. Dieses Verfahren ist möglich, weil alle Kontrollgruppen grundsätzlich gleichartig behandelt worden sind. Unter derselben Bedingung werden zum Teil auch bei den übrigen Versuchsgruppen einzelne Ansätze aus den obigen Versuchen übernommen. Der Sinn dieses Vorgehens besteht darin, durch eine möglichst große Anzahl von Versuchstieren spontane Schwankungen weitgehend auszugleichen. Die bei den einzelnen Versuchsansätzen beobachteten und naturgemäß auch zu erwartenden Abweichungen von einem Mittelwert sind in der Regel nicht so stark, als daß ihre Zugehörigkeit zu einem bestimmten Endergebnis nicht zu erkennen wäre. In einem Fall (Versuchsgruppe A, Ansatz 3) bestehen jedoch erhebliche Zweifel. Das Einzelergebnis fällt mit einer Endmortalität von nur 18 % aus dem durch die übrigen Versuchsansätze gesteckten Rahmen. Bei seiner Berücksichtigung würde sich die errechnete Endmortalität von 55 % auf 47 % senken. Das Ansatzergebnis ist so auffallend gut, daß die Einwirkung eines außerhalb der Versuchsanordnung liegenden Faktors für wahrscheinlich gehalten werden muß. Aus diesem Grunde soll dieser Ansatz zur Bestimmung der Gesamtmortalität der Versuchsgruppe A nicht

Versuch VIII

Versuch	A	B	C	D	E	F
Zahl der Tiere	450	498	445	450	575	719
Zahl der Ansätze	5	6	6	5	8	10
Testsubstanzen	Wasser-in-Öl-Emulsion kompl. Adj. + NaCl	Wasser-in-Öl-Emulsion kompl.Adj.+ wässr. Susp.v. S. t.m.	Wasser-in-Öl-Emulsion inkompl.Adj.+ wässr. Susp.v. S. t.m.	Wasser-in-Öl-Emulsion kompl.Adj.+ wässr. Susp. v. S. t.m.	Wässrige Suspension von S.t.m. (Positive Kontrolle)	(Negative Kontrolle)
Form der Gabe	--- 10 mal oral ---			3 x sc.	10 x oral	----
Einzeldosis in ml	---------- 0,02 ----------					----
Gesamtdosis in ml	------- 0,2 -------			0,06	0,2	----
Gesamtkeimzahl	--- 1,5 x 10^9 -----			9x10^8	15x10^9	----
Infektionsdosis	---- ----- - etwa 5 x 10^8 ----------					
Zahl d.toten Tiere	193	210	235	209	251	470
Endmortalität in %	55	42,2	52,8	46,4	43,8	65,4
D_b	10,4	23,2	12,6	19,0	21,6	----
D_z	8,6	7,8	7,9	8,0	7,3	----
E	1,2	3	1,6	2,4	3	----
Mittl. Sterbetag	12,0	12,1	11,6	11,1	12,1	11,4
Wirkungsindex	15,9	35,5	19,3	29,0	33,0	----

Tabelle 6

hinzugezogen werden, sondern als " Ausreißer " unbewertet bleiben.

Alle Versuchsgruppen wurden bis zum 3o. Tage post inf. beobachtet. Da in den letzten 5 Tagen praktisch keine Tiere mehr starben, sind in den Abscissen der Kurven jeweils nur 25 Tage aufgetragen. Auch die Endmortalität ist für den 25. Tag berechnet. Die zur Bewertung des erreichten Impfschutzes herangezogenen Parameter sind unter "Material und Methoden" ausführlich beschrieben.

Die Gesamtkeimzahl, welche den oral immunisierten Tieren gegeben wurde, beträgt $1,5 \times 10^9$ pro Maus.
Dieser Wert errechnet sich wie folgt:

$10 \times 0,01 \times (1-3) \times 10^{10} = 1,5 \times 10^9$.

(10-malige Gabe von 0,01 ml einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien mit einer Keimzahl von $1 - 3 \times 10^{10}$/ml).

Die wichtigsten Daten über den Aufbau des Hauptversuches sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

Ergebnis des Hauptversuches

In der Abbildung 10 wird der Verlauf aller Mortalitätskurven und in der Abbildung 11 der aller Epidemiekurven aufgezeigt. Ich habe diese gleichzeitige Darstellung aller Versuchsgruppen gewählt, um ihre Gemeinsamkeiten deutlich werden zu lassen. Zur Einzelbesprechung wird jede Versuchsgruppe mit den Kontrollgruppen gesondert aufgeführt. Aus der Abbildung 10 geht hervor, daß alle Mortalitätskurven gleichsinnig verlaufen und sich im Wesentlichen nur quantitativ unterscheiden. Ihre zeitliche Gliederung läßt erkennen, daß der Kurvenanstieg in der ersten Woche post inf. nur langsam erfolgt, zwischen dem 7. und 13. Tag seine größte Steilheit erreicht

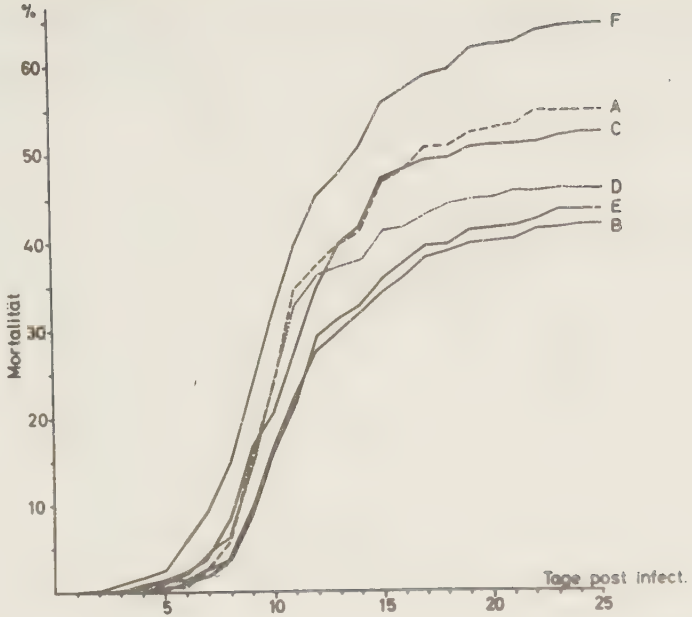

Abb. 1o Hauptversuch VIII. Anstieg der Mortalität nach oraler Infektion mit S.t.m.--Bakterien am 1o. Tag nach Ende der Immunisierung. Form und Rhythmus der Immunisierung sowie Zusammensetzung und Dosierung der Impfstoffe sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Die einzelnen Kurven sind in den Abbildungen 12, 14, 17 und 19 noch einmal gesondert dargestellt.

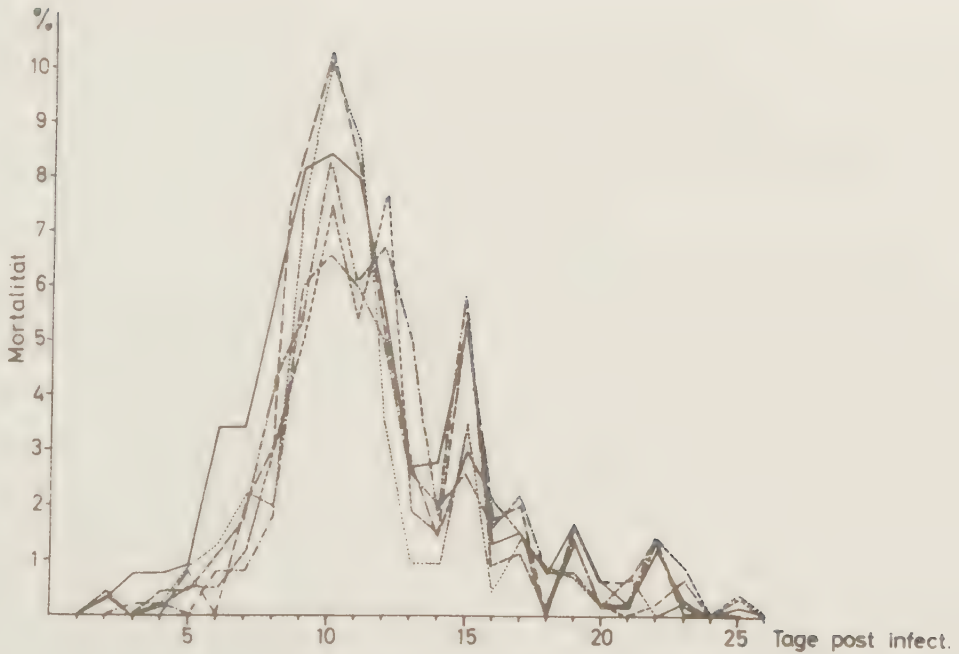

Abb. 11 Hauptversuch VIII. Die täglich beobachtete Mortalität nach oraler Infektion mit S.t.m.-Bakterien in den mit unterschiedlichen Impfstoffen oral und subcutan immunisierten Versuchsgruppen A, B, C, D und E sowie der unbehandelten negativen Kontrolle F. Die einzelnen Kurven sind in den Abbildungen 13, 15, 16, 18 und 20 noch einmal gesondert dargestellt.

und danach in wellenförmigen Bewegungen abflacht. Die Gipfel solcher Wellen sind deutlich am 15., 19. und 22. Tag zu erkennen. Erwartungsgemäß treten die Schwankungen der täglichen Mortalität in der Epidemiekurve (Abb. 11) besonders deutlich hervor. Am 1o. Tag sterben in allen Versuchsgruppen bei weitem die meisten Tiere. Weitere und dabei in ihrer Größe rasch abnehmende Gipfel findet man an den oben genannten Tagen. Die Ursache dieser merkwürdigen Rhythmik, die zuerst von RAETTIG (78) beschrieben wurde, ist nicht bekannt. Sie entspricht dem Verlauf einer Explosionsepidemie mit nachfolgenden Kontaktinfektionen. Aus dem Versuchsaufbau ist diese Beobachtung nicht zu erklären, da alle Tiere gleichzeitig und sicher mit der Schlundsonde infiziert wurden und demnach theoretisch eine reine " Explosionsepidemie " erwartet werden muß. Besonders erwähnenswert erscheint die zeitliche Regelmäßgkeit, mit der diese Schwankungen abzulaufen scheinen. Die von RAETTIG (78), MARWIK (69) und mir gefundenen Zeitwerte weichen nur geringfügig von einander ab. Offensichtlich wird auch durch eine vorausgehende Immunisierung die Rhythmik des epidemischen Geschehens nicht unterbrochen oder wesentlich verändert. Die Beobachtung wurde in den zuvor erwähnten Arbeiten bei der oralen Immunisierung von RAETTIG (78) und bei der Inhalationsimpfung von MARWIK (69) schon früher gemacht. Die vorliegenden Versuche bestätigen diese Ergebnisse und zeigen, daß auch durch die orale oder subkutane Applikation des spezifischen Antigens in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem oder inkomplettem Freundschen Adjuvans keine Änderung des epidemischen Verhaltens bewirkt wird. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, weil bekanntlich nach subkutaner Gabe des Freundschen Adjuvans die Antikörperbildung gesteigert und verzögert erfolgt. Aus der Abbildung 1o geht weiter hervor, daß die Gesamtmortalität der unbehandelten Kontrollmäuse an allen Tagen deutlich die der Versuchsgruppen übersteigt. Diese Aussage trifft für die Tagesmortalität nicht zu. Wie die Mortalitätskurven zeigen, sterben an einzelnen Tagen

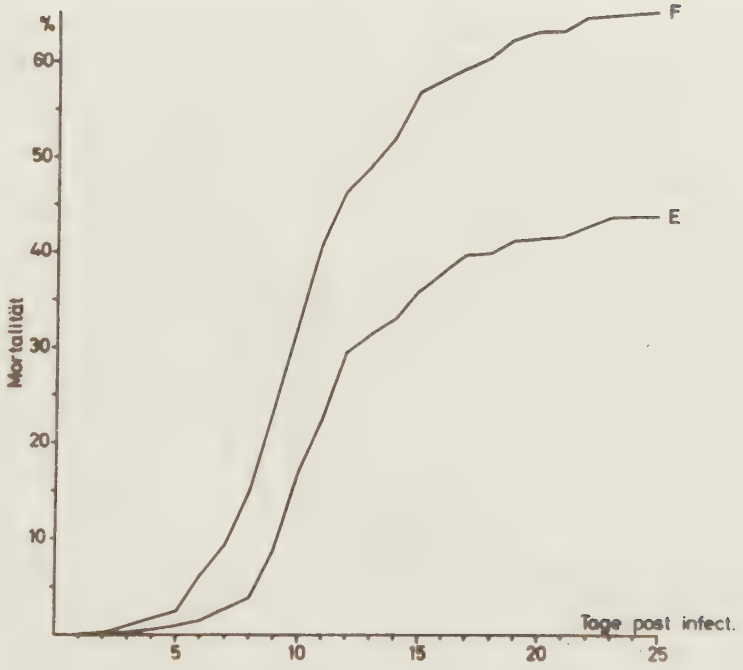

Abb. 12 Der Anstieg der Mortalität post infect. bei 575 mit einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Mäusen der positiven Kontrollgruppe E und 719 nicht geimpften Mäusen der negativen Kontrollgruppe F.

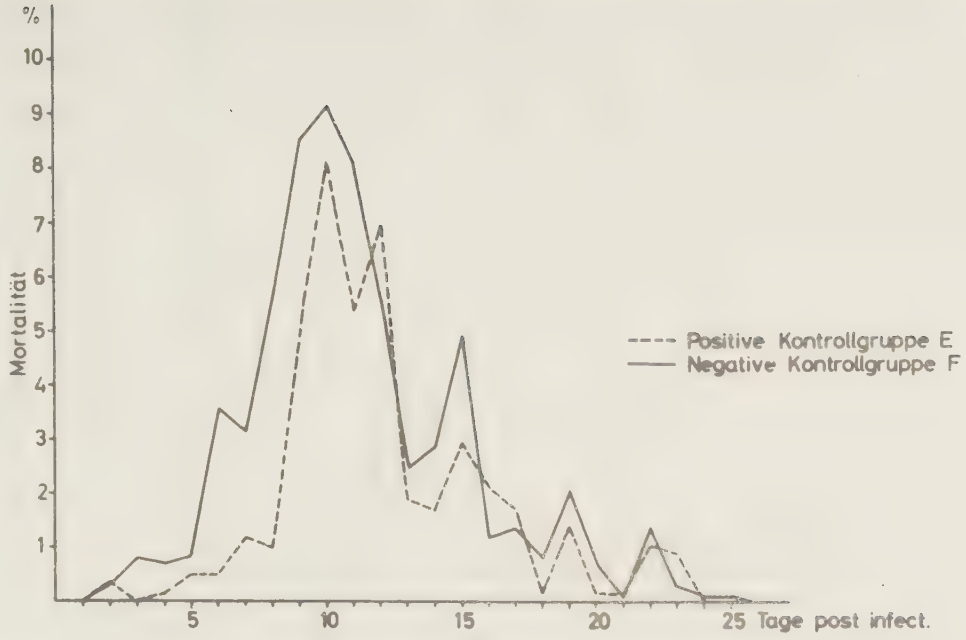

Abb. 13 Die täglich beobachteten Todesfälle nach oraler Infektion mit S.t.murium--Bakterien bei 575 mit einer wässrigen Antigensuspension oral immunisierten Mäusen (positive Kontrollgruppe E) und 719 nicht geimpften Mäusen (negative Kontrollgruppe F).

mehr vorbehandelte als unbehandelte Tiere.

In der Abbildung 12 sind die Mortalitätskurven der positiven und negativen Kontrollgruppe aufgetragen. Die Endmortalität am 25. Tag post inf. beträgt bei den immunisierten Tieren 43,8 % und bei den unbehandelten Kontrolltieren 65,4 %. Die beobachtete Differenz von 21,6 % steht der größtzulässigen Zufallsdifferenz von 7,3 % gegenüber. Die Senkung der Mortalität durch die orale Immunisierung mit einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien ist mit einem Echtheitsgrad von 3 statistisch gesichert. Die absolute Höhe von 43,8 % liegt über den von anderen Untersuchern gefundenen Werten (z.B. RAETTIG, 78). Die Ursache für die vergleichsweise geringe Mortalitätssenkung ist nicht bekannt. Folgende Ursachen sind jedoch in Erwägung zu ziehen: Zum ersten ist die Endmortalität der negativen Kontrolle von 65 % höher als in den Vergleichsgruppen. Es ist vorstellbar, daß mit steigender Virulenz des infizierenden Keimes sich in den immunisierten Versuchsgruppen die Mortalität nicht linear, sondern exponentiell erhöht. Zum zweiten habe ich die Gesamtdosis von $1{,}5 \times 10^9$ hitzeinaktivierten Keimen pro Maus in 10-maligen Einzelgaben von 0,02 ml verabreicht. In den Vergleichsgruppen der anderen Untersucher erhielten die Mäuse dieselbe Keimmenge in 10 Einzeldosen von 0,25 ml. Möglicherweise verbessert das 12,5 mal größere Volumen die Resorptionsquote und damit den Immunisierungseffekt. (Verdünnung der Magen-Salzsäure ?). Der Verlauf der in der Abbildung 13 dargestellten Epidemiekurven ist sehr ähnlich. Die Gipfel täglicher Mortalitätsschwankungen liegen synchron am 10., 15., 20. und 22. Tag. Am 10. Tag sterben - wie auch in allen anderen Versuchsgruppen - die meisten Tiere. Die positive Kontrolle weist darüber hinaus am 13. Tag einen weiteren Gipfel auf, der sich nur noch in der Gruppe C finden läßt. Auf diese Übereinstimmung werde ich später noch ausführlicher eingehen. Der bedeutendste Unter-

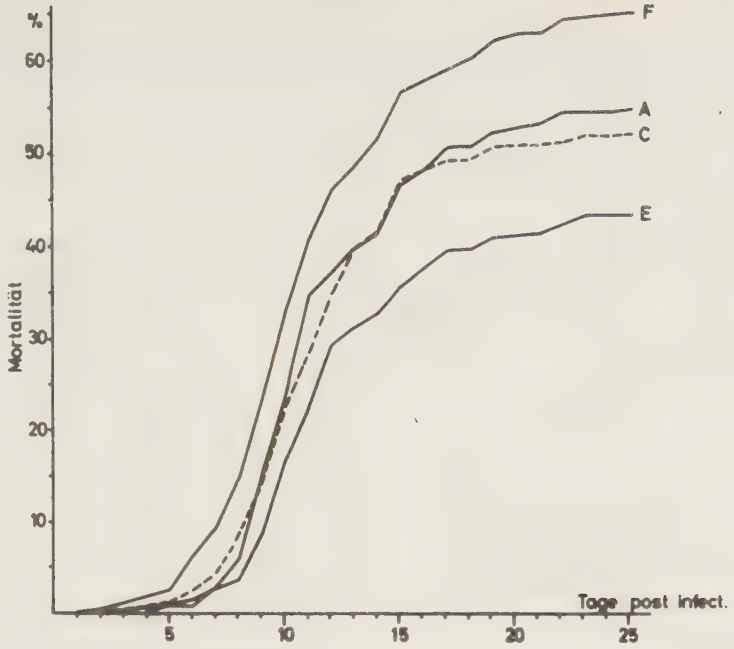

Abb. 14 Der Anstieg der Mortalität post infect. bei 45o mit einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und NaCl oral vorbehandelten Mäusen (Versuchsgruppe A) und 445 mit einer W-I-Ö-Emulsion aus inkompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.murium-Antigen oral immunisierten Mäusen (Versuchsgruppe C). Zum Vergleich die Mortalitätskurven der positiven Kontrollgruppe E und der negativen Kontrollgruppe F.

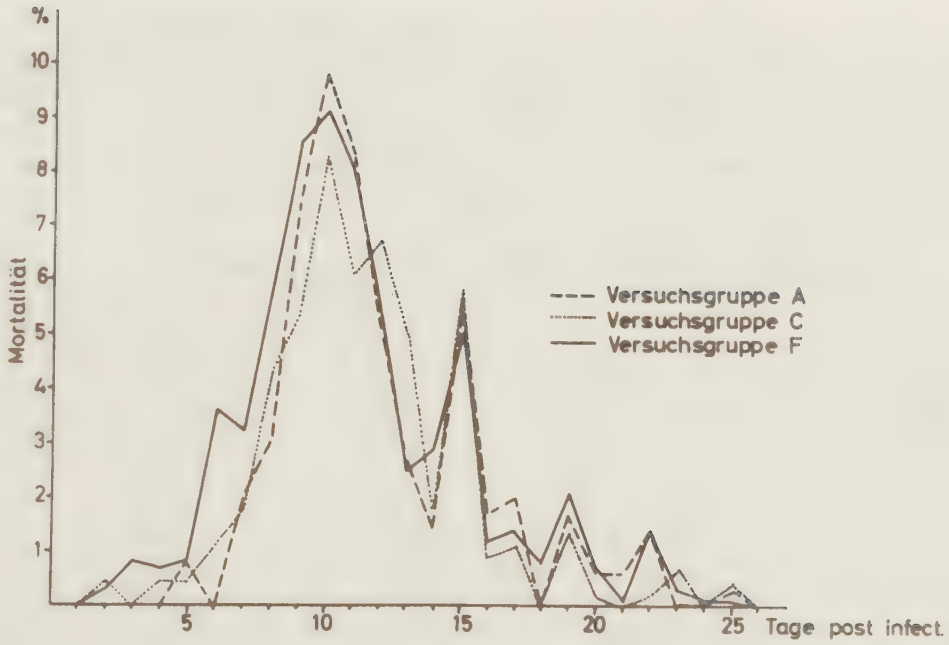

Abb. 15 Die täglich beobachtete Mortalität nach oraler Infektion mit S.t.m.-Bakterien bei 45o mit einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und NaCl oral vorbehandelten Mäusen (Gruppe A) und 445 mit einer W-i-Ö-Emulsion aus inkompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Mäusen (Gruppe C). Zum Vergleich die Mortalität der negativen Kontrolle F.

schied der beiden Epidemiekurven liegt in dem Beginn des Anstieges zur höchsten Tagesmortalität am 1o. Tag. Bei der negativen Kontrolle liegt der Anfang des aufsteigenden Schenkels bereits am 5. Tag, bei der positiven Kontrolle erst am 8. Tag. Diese Verzögerung findet ihren Ausdruck auch bei der Berechnung des mittleren Sterbetages, der für die positive Kontrolle 12,1 und für die negative Kontrolle 11,4 ergibt. Diese Werte liegen um 2,9 bzw 3,5 Tage vor den von RAETTIG (78) gefundenen mittleren Sterbetagen. Bei diesem Vergleich ist zu beachten, daß in den vorliegenden Versuchen - nicht aber bei Raettig - der Infektionstag als erster Tag post infect. gerechnet wird. Diese Beobachtung unterstützt die oben erwähnte Vermutung über die höhere Virulenz des von mir zur Infektion benutzten Keimes.

Als nächstes sind in den Abbildungen 14 und 15 die Mortalitäts- und Epidemiekurven der Versuche A und C aufgetragen. Der Impfschutz in beiden Gruppen ist wesentlich schlechter als in der positiven Kontrolle. Ein solches Ergebnis war eventuell bei der Versuchsgruppe A zu erwarten, da die Mäuse anstelle der wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien nur NaCl in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans erhalten hatten. Wie aus der Abbildung 14 ersichtlich ist, wird durch das komplette Adjuvans auch ohne das spezifische Antigen die Endmortalität von 65,4 % auf 55 % gesenkt. Die beobachtete Differenz von 1o,4 % ist mit einem Echtheitsgrad von 1,2 statistisch gesichert. Allerdings kann dieser Effekt nicht als Ausdruck eines Impfschutzes im engeren, d.h., spezifischen Sinn verstanden werden, sondern lediglich als Folge einer unspezifischen Resistenzsteigerung durch die im Mineralöl suspendierten Mykobakterien, Ich werde auf dieses Problem noch einmal in der Diskussion eingehen.

Im Gegensatz zu diesem in gewisser Weise erwarteten Ergebnis überraschte die hohe Sterblichkeit in der Versuchsgruppe C,

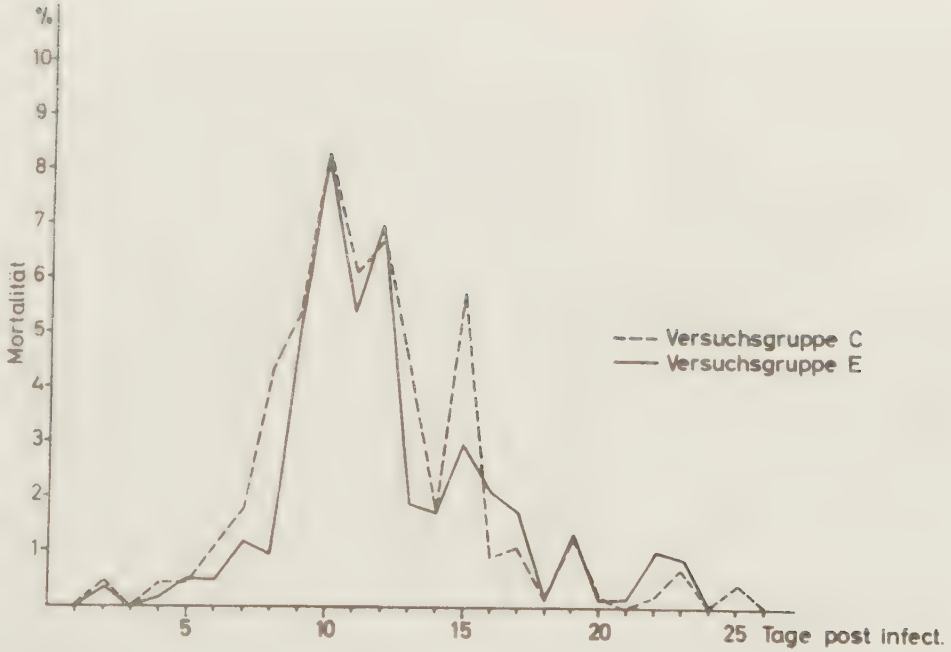

Abb. 16 Die täglich beobachtete Mortalität nach oraler Infektion mit S.t.m.-Bakterien bei 445 mit einer W-i-Ö-Emulsion aus inkompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Mäusen (Versuchsgruppe C) sowie 575 mit einer einfachen wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Mäusen (positive Kontrollgruppe E).

deren Tiere mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien immunisiert worden waren. Die Endmortalität beträgt 52,8 %. Die beobachtete Differenz zur negativen Kontrolle ist mit einem Echtheitsgrad von 1,6 statistisch gesichert. Trotz identischer Antigenmenge ist der Impferfolg mit einem Wirkungsindex von 19,3 absolut und im Vergleich zur positiven Kontrolle (WI = 33) auffallend schlecht. Der mittlere Sterbetag ist der 11,6. Tag und der früheste aller oral immunisierten Gruppen. Die Aufgabe eines Adjuvans besteht definitionsgemäß darin, den Immunisierungserfolg eines bestimmten spezifischen Antigens zu steigern. Dieser Potenzierungseffekt ist unter den gegebenen Umständen des Versuches C in sein Gegenteil verkehrt worden. Die mit dem inkompletten Adjuvans behandelten Mäuse sterben früher und prozentual betrachtet häufiger als die mit einer einfachen Suspension immunisierten Tiere.

In der Abbildung 16 fällt eine große Ähnlichkeit der Epidemiekurve des Versuches C und der positiven Kontrolle E auf. Beide Kurven zeigen gemeinsame Eigenschaften, die allen anderen Kurven fehlen, nämlich Mortalitätsgipfel am 2. und 12. Tag. Auf welchen Ursachen diese Besonderheiten beruhen, ist nicht bekannt. Wichtiger erscheint ihr gemeinsames Vorhandensein gerade in diesen beiden Gruppen. Wie in der Diskussion noch ausführlicher dargestellt wird, fügt sich nämlich das zuerst überraschende und enttäuschende Ergebnis des Versuches C, des Stabilitätsversuches (Versuch I) und des Resorptionsversuches (Versuch VI) mit theoretischen Überlegungen zu einem durchaus sinnvollen Bild. Die wichtigste Folgerung aus dieser Kombination ist, daß die Resorptionsvorgänge für das Antigen bei den verschiedenen Applikationsformen - nämlich Emulsion und Suspension- höchstwahrscheinlich nur quantitativ, jedoch nicht qualitativ unterschiedlich sind. Die weitgehende Übereinstimmung im epidemischen Ablauf der Infektion bei Versuch C und E paßt gut in diese Theorie.

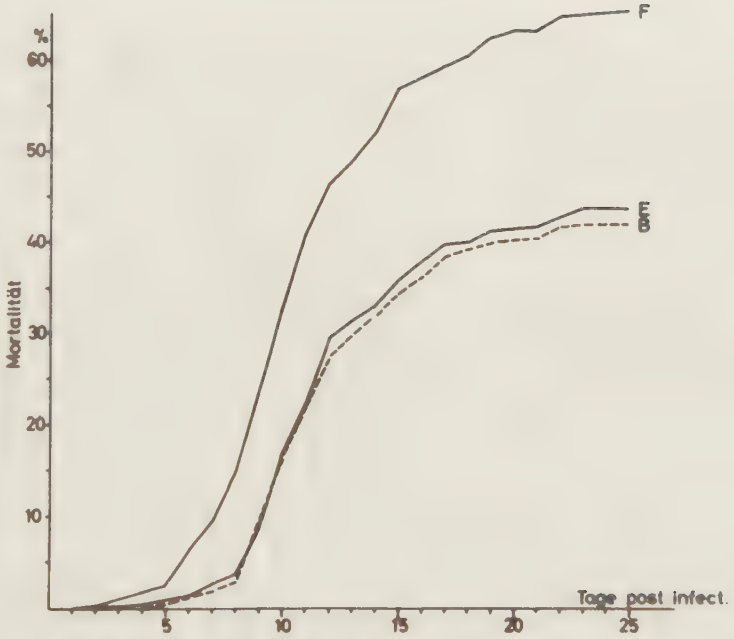

Abb. 17 Der Anstieg der Mortalität post infect. bei 498 mit einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.--Antigen oral immunisierten Mäusen der Versuchsgruppe B. Zum Vergleich die Mortalität der 575 mit einer einfachen wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Mäusen der positiven Kontrolle E und der 719 unbehandelten Mäuse der negativen Kontrollgruppe F.

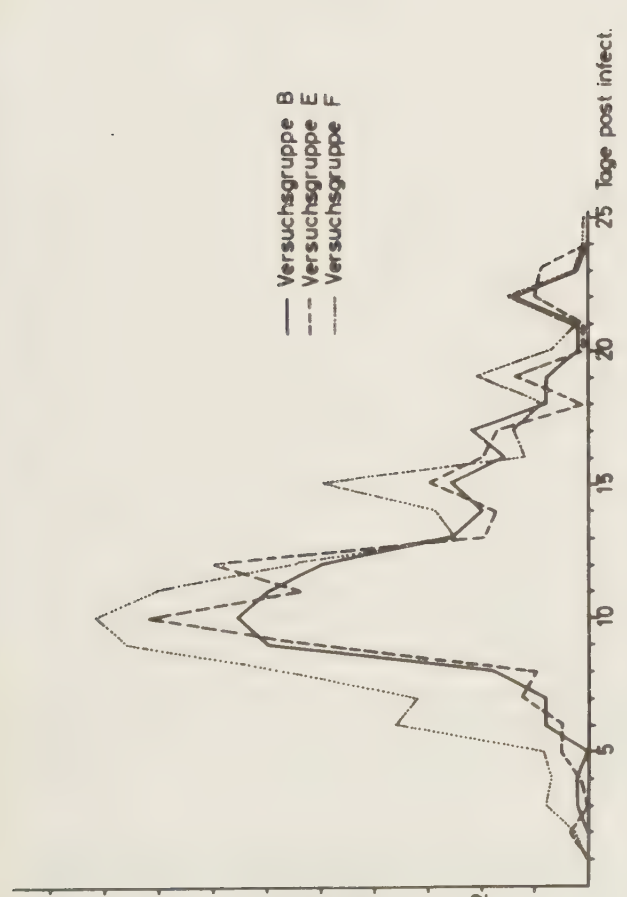

Abb. 18 Die täglich beobachtete Mortalität nach oraler Infektion mit S.t.m.-Bakterien bei 498 mit einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Mäusen (Versuchsgruppe B). Zum Vergleich die Mortalität der 575 mit einer einfachen wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten Mäuse der positiven Kontrolle E sowie der 719 unbehandelten Mäuse der negativen Kontrolle F.

Die günstigen Resultate der Versuche III und IV hatten es zunächst als möglich erscheinen lassen, daß durch das komplette Freundsche Adjuvans bei einer geeigneten Dosierung der Erfolg der oralen Immunisierung erheblich verbessert werden kann. Allerdings hatten die Versuchsergebnisse auch zu der Vermutung Anlaß gegeben, daß schon bei geringen Dosisänderungen ein Umschlag zum Negativen erfolgen kann. Der Versuch B des Hauptversuches, der 5 Ansätze mit insgesamt 45o Mäusen umfaßt, korrigiert die in das komplette Freundsche Adjuvans gesetzten Erwartungen. Der erzielte Wirkungsindex von 35,5 übertrifft den aller Versuchsgruppen. Die Endmortalität ist mit 42,2 % die niedrigste in den vorliegenden Versuchen. Ihr Abstand zur negativen Kontrolle ist mit einem Echtheitsgrad von 3 statistisch gesichert. Trotzdem sind diese Resultate unter dem Gesichtspunkt einer Potenzierung des Impferfolges enttäuschend. Der Abstand zur positiven Kontrollgruppe ist- wie die Abbildung 17 zeigt - nur geringfügig und erst vom 12. Tage an vorhanden. Die Differenz in der Endmortalität von nur 1,6 % muß als bedeutungslos angesehen werden. (Die maximale Häufigkeitsdifferenz zwischen beiden Gruppen beträgt 8,o %). Auch der epidemische Ablauf wird - wie aus Abbildung 18 hervorgeht - nicht wesentlich verändert. Der mittlere Sterbetag ist wie bei der positiven Kontrolle der 12,1. Tag. Zusammenfassend muß also festgestellt werden, daß durch das komplette Freundsche Adjuvans der Erfolg der oralen Immunisierung nicht verbessert wird. Eine Reduzierung des Impfschutzes wie in Versuch C wird dagegen nicht beobachtet.

Als letzter sei der Ausgang des Versuches D besprochen. Die 448 Versuchstiere dieser Gruppe wurden innerhalb von 12 Tagen insgesamt 3-mal subkutan mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien immunisiert. Wie aus der Abbildung 19 hervorgeht, ist der Impferfolg nicht ganz so gut wie bei der positiven Kontrolle. Die Endmortalität beträgt 46,4 % und ist

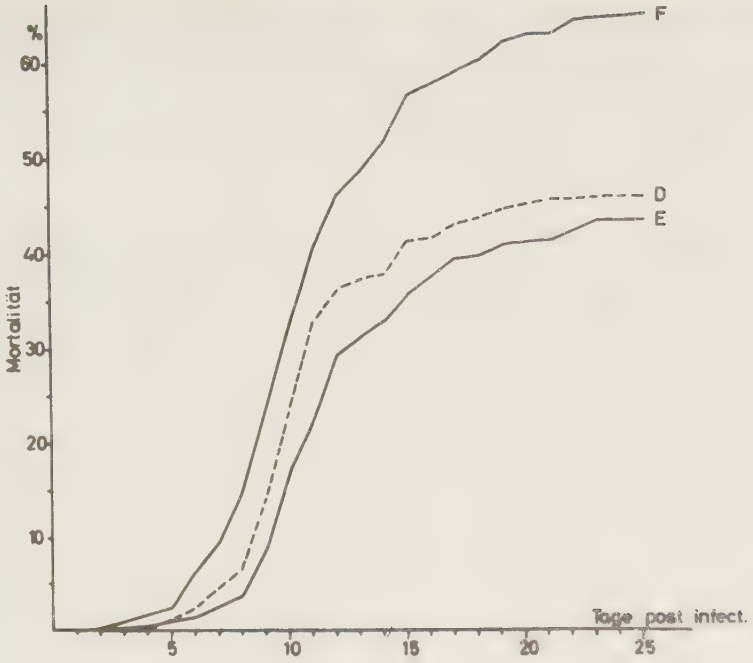

Abb. 19 Anstieg der Mortalität post infect. bei 45o mit einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen subcutan immunisierten Mäusen der Versuchsgruppe D. Zum Vergleich die Mortalität der mit einer einfachen wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten positiven Kontrollgruppe E und der unbehandelten negativen Kontrollgruppe F.

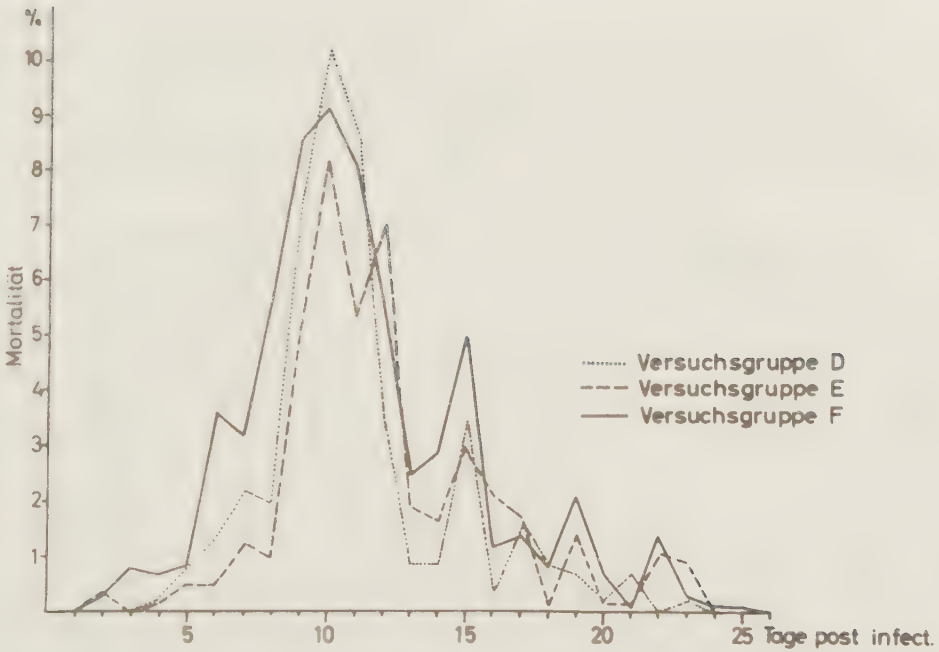

Abb. 2o Die täglich beobachtete Mortalität bei 45o mit einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen subcutan immunisierten Mäusen der Versuchsgruppe D. Zum Vergleich die Mortalität der mit einer einfachen wässrigen Suspension von S.t.m.-Antigen oral immunisierten positiven Kontrollgruppe E und der unbehandelten negativen Kontrollgruppe F.

mit einem Echtheitsgrad von 2,4 statistisch gesichert. Auffällig ist der Wert für den mittleren Sterbetag von 11,1. Er ist der früheste Zeitpunkt aller Versuchsgruppen einschließlich der negativen Kontrolle. Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, weil die subkutanen und oral applizierten Antigendosen sich wie 1 : 3 verhalten. Nach neueren Untersuchungen (RAUSS und KETYI, 84; RAETTIG, 8o) wird angenommen, daß für den Aufbau eines gleichwertigen Impfschutzes durch orale Immunisierung das 1oo-fache der subkutanen Dosis erforderlich ist. Das Verhältnis verschlechtert sich bis 1 : 4oo zu Ungunsten der oralen Antigengabe, wenn bei der subkutanen Gabe ein Adsorbat-Impfstoff verwendet wird (84). Nach diesen Angaben ist die in der Versuchsgruppe D gewählte Dosis um den Faktor 33 bzw. 133 größer, als für einen gleichwertigen Schutz notwendig wäre. Trotz dieser erheblichen " Überdosierung " fällt der erzielte Impferfolg schlechter als in der oral immunisierten Kontrollgruppe aus.

Bei der Diskussion möglicher Ursachen ergab sich u.a. die Vermutung, daß das relativ ungünstige Ergebnis durch einen ungeeigneten, d.h., zu frühen Infektionstermin bedingt sein könnte. In einer von HALBERT, MUDD und SMOLENS (44) veröffentlichten Untersuchung über die subkutane Immunisierung der Maus mit Shigella paradysenteriae-Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion wird ein zweigipfliger Verlauf der Antikörper-Titer-Kurve beschrieben. Ein erster kleiner Gipfel (1 : 4o) ist nach einer Woche zu finden. Danach fällt die Kurve auf ihren Ausgangswert zurück, um erst wieder nach 1o Wochen zu einem erheblich höheren (1 : 256) Plateau anzusteigen, das über 4 Wochen konstant bleibt und später sehr langsam abflacht. Ohne die Höhe des Antikörpertiters zu einem Maßstab der belastbaren Immunität zu machen, kann auf Grund dieser Angaben nicht ausgeschlossen werden, daß auch in dem Versuch D das Optimum des Impfschutzes erst sehr spät erreicht wird. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden in

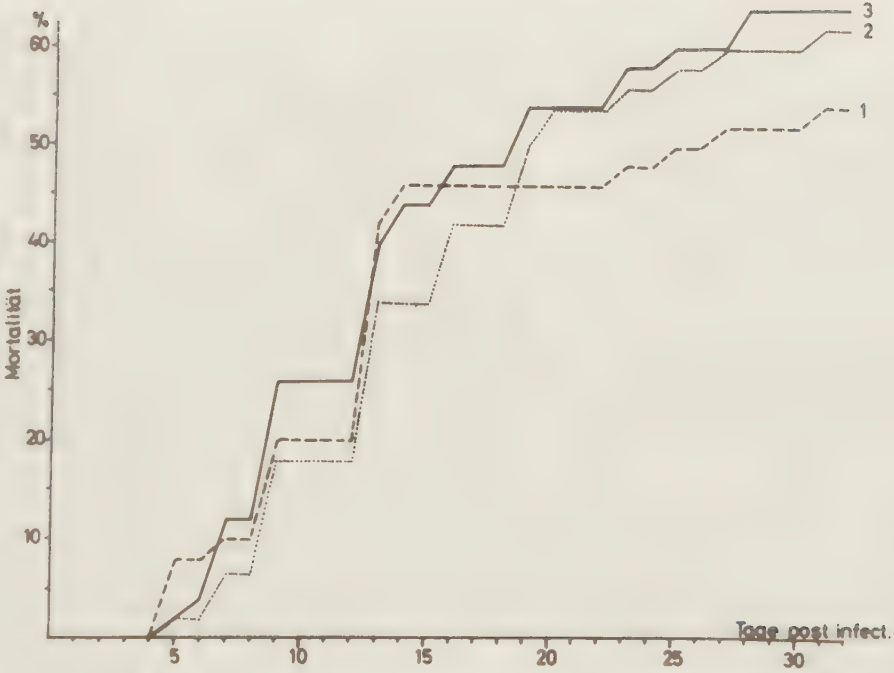

Abb. 21 Anstieg der Mortalität bei je 5o mit einer W-i-Ö-Emulsion aus kompl. bzw. inkompl. Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S.t.m.--Antigen subcutan immunisierten Mäusen der Versuchsgruppen 1 und 2 sowie der negativen Kontrollgruppe 3. Die orale Infektion erfolgte in diesem Versuch erst am 2o. Tag nach Beendigung der Immunisierung.

einem zusätzlichen Versuch je 5o Mäuse mit einer Emulsion aus komplettem und inkomplettem Adjuvans in derselben Weise wie bei Versuch D behandelt, jedoch nicht wie üblich am 1o. Tag, sondern erst am 2o. Tag infiziert. Wie man aus der Abbildung 21 entnehmen kann, sind die Resultate erheblich schlechter als bei Versuch D. In der mit dem inkompletten Adjuvans immunisierten Gruppe ist nach 2o Tagen kein Schutz mehr nachweisbar. Das Ergebnis schließt natürlich nicht die Möglichkeit aus, daß zu einem noch späteren Zeitpunkt eine bessere Immunitätslage bestehen könnte. Dieser Frage im Rahmen der gewählten Versuchsmethodik nachzugehen, erschien nicht sinnvoll. Da die Mäuse mit steigendem Lebensalter zunehmend resistenter gegen eine Infektion mit S. typhi murium-Bakterien werden, könnten bei einer weiteren Hinauszögerung des Infektionstermines leicht zu günstige Ergebnisse vorgetäuscht werden.

E. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Frage geprüft, ob durch die Verwendung von komplettem und inkomplettem Freundschen Adjuvans der Impfschutz bei der oralen Immunisierung verbessert werden kann. Obwohl das Freundsche Adjuvans in der experimentellen Medizin häufig benutzt wird, habe ich in der umfangreichen Literatur keinen Fall gefunden, in dem das Adjuvans oral appliziert worden ist. Offenbar wird auf Grund der Vorstellung von der Nichtresorbierbarkeit der Mineralöle präjudiziert, daß nur eine parenterale Applikation des Adjuvans wirkungsvoll sein kann. Ich möchte deshalb zunächst zeigen, daß nach den augenblicklichen Kenntnissen von der Wirkweise des Freundschen Adjuvans der Gedanke der oralen Gabe zwar ungewohnt, aber durchaus einer Nachprüfung wert ist.

Trotz zahlreicher intensiver Bemühungen ist nicht hinreichend bekannt, wie es zu der Wirkung des Freundschen Adjuvans kommt. Es gibt eine Reihe von Erklärungsversuchen, die jedoch jeweils nur einen Teilaspekt des Problems zu erfassen scheinen. Dieser Mangel ist offenbar darin begründet, daß das Freundsche Adjuvans nicht ein einfaches Wirkungsprinzip, sondern eine Reihe vielgestaltiger Mechanismen in Gang setzt, wobei man vor allem hinsichtlich der Wirkweise der Mykobakterien weitgehend auf Spekulationen angewiesen ist (FINGER, 27). Eine wichtige Teilfunktion der Wirkung ist die Verzögerung der Antigenresorption aus dem an der Injektionsstelle gesetzten Primärdepot. Das Mineralöl umschließt als eine durch körpereigene Fermentsysteme nicht angreifbare Schutzhülle die wässrige Antigenphase. Aus diesem Depot wird das Antigen nur langsam und in kleinen Mengen freigesetzt, so daß ein antigenetischer Dauerreiz garantiert ist (HENNEBERG, 45, 46). Darüberhinaus hat das Öl höchstwahrscheinlich die Aufgabe, als schützender Transportmechanismus das Antigen vom Primär-

depot durch das lymphatische System zu den antikörperbildenden Zentren des Reticuloendothelialen-Systems zu befördern (CASALS und FREUND, 14; HAGAN und LEVINE, 42; RIST, 9o; WHITE et al., 11o). In diesen sekundären Depots kommt es zu einer Reizwirkung des Mineralöls auf die Zellen des RES, sowie zu einer Beeinflussung durch die Mykobakterien in dem Sinne, daß der Organismus gegenüber dem inkorporierten Antigen mit einem der Tuberkulinreaktion entsprechenden Typus der Empfindlichkeit reagiert. Dieser letztgenannte Vorgang unterscheidet das Freundsche Adjuvans von allen anderen als Adjuvantien gebräuchlichen Substanzen (FINGER, 27).

Betrachtet man diese hier nur stark vereinfacht dargestellten Vorgänge vom Standpunkt der oralen Immunisierung, so bietet sich der Gedanke an, diese Wirkungsmechanismen von der Ebene der parenteralen auf die der enteralen Resorption zu übertragen. Ohne die Vergleichbarkeit beider Resorptionssysteme übermäßig zu strapazieren, läßt sich das folgende der parenteralen Resorptionssituation analoge Denkmodell aufbauen.

1. Die Wasser-in-Öl-Emulsion aus Freundschem Adjuvans und der wässrigen Antigenphase wird nicht parenteral, sondern oral appliziert.
2. Das Antigen passiert - von der nicht angreifbaren Mineralölhülle geschützt den Magen - und erreicht ohne Verlust den Dünndarm.
3. Die im Lumen des Dünndarms vorhandene Emulsion entspricht dem Primärdepot an der Injektionsstelle.
4. Aus diesem Primärdepot werden - wiederum ohne Beeinflussung durch die Verdauungssäfte des Dünndarms - kleine, mit einem Ölmantel geschützte Tropfen der Antigenphase resorbiert.

5. Das Antigen gelangt mitsamt der schützenden Ölhülle in das mesenteriale Lymphsystem und wird über den Ductus thoracicus in den venösen Kreislauf transportiert.
6. Es kommt zur Ausbildung sekundärer Depots in den Immunkompetenten Zentren des RES. Von diesem Punkt ab sind die Verhältnisse mit denen bei parenteraler Injektion identisch.

Das Kernstück dieses Denkmodells ist die Vorstellung, daß das von einer Hülle aus Mineralöl geschützte Antigen unbeeinflußt von den Einwirkungen der Verdauungssäfte ohne Wirkungsverlust zur Resorption kommt. Wenn sich diese Hypothese in der Praxis als richtig und realisierbar herausstellen sollte, wären auf einfache Weise die Vorteile der oralen und parenteralen Applikation kombiniert.
Eine Schwäche der oralen Immunisierung ist der Verlust an antigenetisch wirksamer Substanz. Das Defizit ist bei inaktivierten Bakterien wahrscheinlich größer als bei lebenden und vermehrungsfähigen Keimen. Diese scheinen sich - jedenfalls in einem gewissen Umfang - vor dem enzymatischen Abbau im Magen-Darm-Kanal schützen zu können (KORTH, 59). Inaktivierte Salmonellen bestehen aus organischen Substanzen, die normalerweise der Verdauung anheimfallen. Voraussetzung für die Wirksamkeit der oral applizierten Salmonella-Antigene ist aber die Passage der physikalisch und biochemisch definierten Schranke der Darmschleimhaut im nativen, d.h. nicht gespaltenen Zustand. Die O-Antigene der Salmonellen stellen kompliziert aufgebaute Lipopolysaccharid-Protein-Lipoid-Symplexe dar und haben ein Molekulargewicht von etwa 1o ooo bis 2o ooo (WESTPHAL und LYDERITZ, 1o9). Nach Untersuchungen von EBEL (23) sowie von GRUSKAY und COCKE (41) soll nur etwa 1 °/oo eines oral gegebenen Fremdeiweißes im nativen Zustand durch Persorption aufgenommen werden. Wahrscheinlich ist der tatsächlich zur Wirkung kommende Anteil noch geringer, da möglicherweise ein weiterer Abbau in der Leber erfolgt.

HAJOS (43) konnte bereits 1924 zeigen, daß sich regelmäßig anaphylaktische Reaktionen auf Futtereiweiß auslösen lassen, wenn zuvor eine genügend große Funktionsschädigung der Leber erzeugt worden war. Erwartungsgemäß ist der Resorptionsquotient von 1 : 1ooo in allen Fällen höher, in denen es durch Krankheit oder experimentelle Einwirkung zu einem Ausfall der Verdauungstätigkeit kommt (EBEL, 23).
Auch Hunger und Erschöpfung erhöhen die Durchlässigkeit des Intestinaltraktes (FICKER, 25, 26).
Von anderen Untersuchern wird der Funktionsverlust eines oral applizierten Antigens niedriger angesetzt. Bei der Immunisierung der Maus mit S. typhi murium-Bakterien liegt das Wirkungsverhältnis zwischen oraler und parenteraler Antigengabe bei serologischer Prüfung nur in der Größenordnung 1 : 1oo (RAETTIG, 8o). Der gleiche Wert wird auch von RAUSS und KETYI (84) für die Immunisierung der Maus mit Shigella flexneri angegeben.

Alle bisher gemachten Überlegungen münden in der zentralen Fragestellung, ob eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus Mineralöl enteral überhaupt resorbiert werden kann. Zu diesem Problem gibt es in der im Ganzen gesehen sehr spärlichen Literatur keine Veröffentlichungen. Dagegen ist es bekannt, daß Mineralöl als Öl-in-Wasser-Emulsion unter bestimmten Bedingungen in erheblichem Umfang resorbiert wird.

Zum besseren Verständnis des Folgenden ist es notwendig, kurz auf die Grundvorgänge bei der Aufnahme von Stoffen aus dem Darmlumen - allgemein Resorption, Absorption genannt - einzugehen. Es lassen sich drei verschiedene zelluläre Mechanismen unterscheiden, nämlich Diffusion, Resorption (im engeren Sinn) und Mikropinocytose. Bei der Diffusion wird die Zelle passiv von molekular gelösten Stoffen durchströmt. Die Resorption (im engeren Sinn) stellt eine aktive Transportleistung der Zelle für Stoffe in demselben Größenbereich dar.

Bei der Mikropinocytose können darüberhinaus auch kleinste Korpuskeln bis zu einer Größe von 2oo Å durch die Zelle geschleust werden (VOLKHEIMER, 1o4). Zusätzlich zu diesen zellulären Vorgängen ist der mechanische Durchtritt großer ungelöster Partikel aus dem Verdauungstrakt in den Organismus möglich. Dieser para-zelluläre Aufnahmemechanismus wird als Persorption oder " Herbst-Effekt " bezeichnet (VOLKHEIMER, 1o3, 1o4, 1o5, 1o6). Die klassische Theorie von der Aufnahme der Fette kennt nur die zelluläre Resorption nach vorhergehender hydrolytischer Spaltung in Glycerin und Fettsäuren und späterer Resynthese. Mineralöle können, da sie als aliphatische Kohlenwasserstoffe nicht verseifbar sind, auf diesem Wege nicht resorbiert werden.

Diese Schlußfolgerung war die Ursache weitreichender Kontroversen. In der Zeit von etwa 1895 bis 1945 erschienen eine Reihe Veröffentlichungen, die Argumente teils für und teils gegen die Möglichkeit der Resorption von Mineralölen enthielten. Die wohl allgemeine Meinung, daß Mineralöle nicht vom Darm aufgenommen werden können, wurde z.B. von HENRIQUES und HANSEN (47), BLOOR (7) und MELLANBY (71) unterstützt. Eine Resorption für möglich oder sogar gesichert hielten dagegen SCHMIDT (92), BRADLEY und GASSER (8), CHANNON und COLLINSON (17), TWORT und TWORT (1oo), TARTINI (97) und andere. Die Frage der Resorbierbarkeit war nicht nur von akademischem, sondern auch von großem praktischen Interesse. Mineralöle hatten nämlich zeitweise als Ersatz für pflanzliche und tierische Speisefette (STUBENRATH, 96; DUNBAR, 22) und als innerlich anzuwendende Arzneimittel Eingang in die Lebensmittelbetriebe und die pharmazeutische Industrie gefunden und erfreuten sich offensichtlich weiter Verbreitung. Bezüglich der Anwendung als Pharmakon interessierte besonders der Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von aus Mineralöl bestehenden Laxantien, Nasentropfen und Halssprays und der Pathogenese von nicht selten letalen Lungenindurationen, die

als Ölpneumonien und Lungenparaffinome beschrieben wurden (MØLLER, 73; KAUFMANN, 53). Aus einigen Veröffentlichungen, z.B. CANNON (14), geht klar hervor, daß das Öl auf dem Luftwege in die Lunge gelangt war. In anderen Arbeiten, z.B. LAUGHLEN (62) wird vermutet, daß das Mineralöl nach enteraler Resorption sekundär in der Lunge abgelagert wurde.

In einer zusammenfassenden Untersuchung konnte STRYKER (95) endgültig den Nachweis dafür erbringen, daß Mineralöle vom Darm aus aufgenommen werden können. Er wies mit histologischen und chemisch-quantitativen Methoden das resorbierte Öl in den Mesenteriallymphknoten, in der Leber, in der Milz, in der Darmwand - aber nie in der Lunge nach. Die Befunde wurden an verschiedenen Versuchstierarten und auch am Menschen erhoben. STRYKER konnte positive Ergebnisse nur dann finden, wenn das Mineralöl nicht nur in ausreichenden Dosen, sondern auch regelmäßig über längere Zeit gegeben worden war. Nach diesen Beobachtungen ist z.B. mit einer Resorption von meßbaren Mengen zu rechnen, wenn zur Behandlung einer chronischen Obstipation viele Monate lang Mineralöl enthaltende Laxantien eingenommen werden.

Eine Erklärung für die empirisch bewiesene, aber theoretisch nicht vorstellbare Resorption von Mineralölen aus dem Darm wurde durch die grundlegenden Untersuchungen von FRAZER et al. (32, 33, zit. in 60) gegeben. FRAZER zeigte, daß der weitaus größte Teil der Triglyceride unhydrolysiert in Form von Partikeln durch feine Kanäle der äußeren Membran (sog. Bürstensaum) in die Epithelzelle gelangt und von dort chylös über den Ductus thoracicus abtransportiert wird. Diese Kanäle sollen die Zellwand rechtwinklig durchqueren und bis zu einer Größe von 0,5 µ durchgängig sein (BAKER, 2).

WOTTON und ZWEMER (112) hatten bereits 1939 Fotos veröffentlicht, auf denen zu sehen sein soll, wie kleine Fettpatikel diese Kanäle durchwandern. Dieser Resorptionsweg, den FRAZER " particulate resorption " nennt, kann auch von Mineralölen

benutzt werden. Voraussetzung ist, daß die Mineralölpartikel einen Durchmesser von weniger als o,5 µ haben. Diese Bedingung wird nur von sehr fein dispergierten Öl-in-Wasser-Emulsionen erfüllt. Solche Emulsionen werden fast ebenso vollständig wie Triglyceride aus dem Darm aufgenommen, während die Resorptionsquote für " roh " verabreichte Mineralöle nur minimal ist. In dieser Tatsache liegt wahrscheinlich die Erklärung für die gegensätzlichen Beobachtungsergebnisse der oben erwähnten Autoren.

Grundsätzlich zu unterscheiden sind diese zellulären Resorptionsmechanismen von der durch VOLKHEIMER (1o4, 1o5, 1o6) beschriebenen Persorption. Dieser Vorgang ist als parazelluläre Aufnahme großkorpuskulärer Stoffe aus dem Darmlumen definiert und schon seit mehr als 125 Jahren bekannt. 1843 entdeckte HERBST (48) den Übertritt von Stärkekörnern aus dem Darmlumen in den Chylus. In der Folgezeit wurden diese Beobachtungen mehrfach bestätigt (21, 5o, 67, 76, 1o2), meist jedoch auf Grund theoretischer Erwägungen für unglaubwürdig gehalten.

1963 veröffentlichte VOLKHEIMER (1o3) eine zusammenfassende Arbeit über Resorptionsversuche mit Modellkörpern unterschiedlicher Größe zwischen 5 und 11o µ . Zwei bis drei Stunden nach der Fütterung waren diese Modellkörper bis zu einem Durchmesser von 7o µ bei allen Tieren im Chylus und Blut nachweisbar. Bei einzelnen Tieren wurden Modellkörper bis 9o µ gefunden. Ein Größenvergleich zwischen dem Durchmesser der Korpuskeln von 7o µ und der dem Darmlumen zugewandten Oberfläche der Epithelzellen von etwa 6 - 8 µ zeigt, daß es sich um eine parazelluläre Immigration handeln muß. Die Korpuskeln werden mit Hilfe der Muskularis mucosae durch feine Spalten in der Epithelzellschicht geknetet und chylös über den Ductus thoracicus und über den Pfortaderkreislauf abtransportiert. Der Persorptionsvorgang soll in allen Darmabschnitten möglich sein. Er findet jedoch vorwiegend an Stellen statt, die eine gesteigerte Motorik der

Muskularis mucosae oder Desquamationszonen des Epithels aufweisen.

Diese letztgenannte Tatsache erklärt wahrscheinlich auf einfache Weise die Wirkung der Gallenvorbehandlung nach BESREDKA und die vieler anderer Adjuvantien, deren Sensibilisierungseffekt auf einer Desquamation des Epithels beruhte.

Anstelle unbelebter Korpuskeln können auch lebende Mikroorganismen als Modellkörper benutzt werden. RAETTIG (81, 82) wies nach, daß T_3 - Coli - Phagen (Durchmesser 45 mμ) und Columbia SK Viren (Durchmesser 33 mμ) die Darmwand unverändert passieren und bereits nach wenigen Minuten im strömenden Blut nachweisbar sind. Auf Grund der kurzen Durchdringungszeit kann als sicher angenommen werden, daß die typischen Resorptionskurven mit Maxima bei 3o Minuten einen parazellulären Persorptionsvorgang beschreiben. Völlig gleichartige Versuchsergebnisse wurden von FUNK (38) für die Resorption von Candida albicans veröffentlicht. Da die Candida-Pilze einen Durchmesser von 6 μ und mehr haben, ist eine zelluläre Passage mit Sicherheit auszuschließen. Auch die von mir in dem Versuch VI durchgeführten Resorptionsversuche mit virulenten Salmonellen (Länge 1 - 3 μ, Dicke o,3 - o,7 μ) befinden sich in Übereinstimmung mit den oben genannten Arbeiten und bestätigen die parazelluläre Persorption.

Der Ausgangspunkt der Überlegungen zur Resorption war die Frage, ob die von mir verwendete Wasser-in-Öl-Emulsion stabil aus dem Darmlumen aufgenommen werden kann. Nach den oben gemachten Ausführungen wäre das nur - falls man die Existenz eines weiteren, noch nicht bekannten Mechanismus der Fettresorption ausschließt - auf dem Wege der Persorption möglich. Da die in der wässrigen Phase inkorporierten Salmonellen 1 - 3 μ lang sind, müssen die kleinsten sie einschließenden Wassertröpfchen einen Mindestdurchmesser von mehreren μ besitzen. Nach einer von FREUND und BONANTO (35) veröffentlichten Skizze ist anzunehmen, daß der mittlere Durchmesser

der Wassertröpfchen in der Emulsion etwa zwischen 5 und 15 µ liegt. Damit scheidet die Möglichkeit einer zellulären Resorption einschließlich der " particulate resorption " der stabilen Emulsion aus. Die Grenzgröße der Persorption beträgt etwa 7o µ . Die durchschnittliche Partikelgröße der Emulsion liegt unter diesem Wert. Nur an diesem Kriterium gemessen, müßte eine Persorption der Emulsion möglich sein. Es ist allerdings fraglich, ob die von VOLKHEIMER (1o3) für Korpuskeln von fester Konsistenz (z.B. PVC-Kugeln, Stärkekörnern, Diatomeen, Zellulose-Partikel, Sporen, Bruchstücke von Muskel- und Knochengewebe sowie von Krebs- und Hummerschalen, Kristalle, Eisenpartikel und Hefezellen) gemachten Aussagen auf eine Wasser-in-Öl-Emulsion übertragbar sind. Es ist nur schwer vorstellbar, daß die von einem Ölmantel umschlossenen Wasserbläschen den oben beschriebenen Knetvorgang bei der parazellulären Immigration stabil überstehen. Wahrscheinlicher ist wohl, daß die Emulsion auch auf diesem Wege nicht oder nur in geringem Umfang stabil aufgenommen werden kann. Auch VOLKHEIMER (1o5) weist darauf hin, daß die Persorptionsfähigkeit der Partikel nicht nur von ihrer Größe, sondern auch von ihrer Konsistenz abhängig ist.
Diese Schlußfolgerungen stehen im Übereinklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Versuche und können sie weitgehend erklären. Im Folgenden möchte ich die wichtigsten Resultate meines Hauptversuches im Sinne der oben gemachten Ausführungen interpretieren.
In bezug auf Einzelheiten und genaue Werte verweise ich auf die Versuchsbeschreibungen.

Der Versuch A des Hauptversuches zeigt, daß das komplette Freundsche Adjuvans allein, d.h. ohne spezifisches Antigen, die Endmortalität in geringem Umfang senken kann. Dieser statistisch gesicherte Schutz muß als Folge einer unspezifischen Resistenzsteigerung verstanden werden. Da nach oraler Gabe von Mineralöl allein (= inkomplettes Adjuvans) ein gleichartiger Effekt nicht beobachtet wird, kann man annehmen, daß die Resistenzsteigerung eine Funktion der im Mineralöl suspendierten

Mykobakterien ist (Mineralöl und Mykobakterien = komplettes Freundsches Adjuvans). Diese Beobachtung überrascht nicht. Es ist bekannt, daß abgetötete und in besonderem Maße lebende Mykobakterien die unspezifischen Abwehrmechanismen des Makroorganismus aktivieren und die Bereitschaft zu spezifisch immunologischen Reaktionen erhöhen. Das Wissen um diese Wirkung der Mykobakterien bildete übrigens einen der wichtigsten Ausgangspunkte bei der Entwicklung des Freundschen Adjuvans, welches nicht als Produkt einer isolierten Erfindung, sondern eher als sinnvolle Zusammenstellung verschiedener bekannter Wirkungsmechanismen verstanden werden muß (FINGER, 27).

Durch die Kombination des spezifischen Antigens mit dem inkompletten Freundschen Adjuvans wird der Impferfolg nicht verbessert, sondern entgegen ursprünglichen Erwartungen erheblich verschlechtert. Dieses Ergebnis brachte der Ausgang des Versuches C des Hauptversuches. Es ist naheliegend, die negative Wirkung des inkompletten Adjuvans aus einer Schädigung entweder der Versuchstiere oder des Antigens zu erklären. Eine Vorschädigung der Mäuse durch das inkomplette Adjuvans kann ausgeschlossen werden, weil die geringe Mineralölgesamtdosis von nur 1o x o,o1 ml in den Versuchen II und III als unschädlich erkannt wurde. Damit wird eine qualitative oder quantitative Schädigung des Antigens wahrscheinlich. Für die Annahme einer qualitativen Beeinträchtigung lassen sich in den vorliegenden Versuchen keine Hinweise finden. Sie ist außerdem nicht zu erwarten, weil die hitzeinaktivierten Salmonellen nicht direkt im Mineralöl suspendiert sind. Sie befinden sich bekanntlich in der wässrigen Phase der Wasser-in-Öl-Emulsion. Ein direkter Kontakt zwischen Antigen und Mineralöl ist damit nicht gegeben. Durch den Ausschluß aller anderen Erklärungsversuche wird die Wahrscheinlichkeit einer quantitativen Beeinträchtigung des Antigens erhöht. Die Ursache für die mangelhafte Wirkung muß also in einer Reduzierung der resorbierten Antigenmenge gesucht werden. In von RAETTIG veröffentlichten Dosierungsversuchen (79) verlaufen die Mortalitätskurven für

Versuchsgruppen, die mit einer Gesamtkeimzahl von $1o^7$, $1o^8$ und $1o^9$ in Form einer wässrigen Suspension immunisiert worden waren, relativ dicht beieinander. In meinen Versuchen ist der Abstand der Kurven der Gruppe C und der positiven Kontrolle so groß, daß ein erheblicher Verlust der oral applizierten Antigenmenge angenommen werden muß.

Nach der Stabilität der Wasser-in-Öl-Emulsion unter In-vitro--Bedingungen (Versuch I) zu urteilen, bleibt wahrscheinlich der größte Teil der Emulsion bei der Passage des Verdauungstraktes stabil und damit unresorbierbar. Das in der wässrigen Phase der Emulsion inkorporierte Antigen passiert, ohne die Möglichkeit wirksam zu werden, den Darm und geht mit den Faeces verloren. Nur der aus instabil gewordener Emulsion freigesetzte Antigenanteil kann resorbiert werden. Diese Annahme wird durch das Ergebnis des Resorptionsversuches (Versuch VI) unterstützt und ergänzt. Die Resorptionsquote von virulenten Salmonellen aus einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans ist gegenüber der von Salmonellen aus einer wässrigen Suspension deutlich erniedrigt. Da nach RAETTIG (82) der Verlauf der Resorptionsbakteriämie bei qualitativer Meßmethodik wenig dosisabhängig ist, besteht auch hier ein Hinweis auf einen beträchtlichen Antigenverlust. Der verzögerte Anstieg bei relativer Abflachung der Resorptionskurve fügt sich ebenfalls in dieses Bild: Die Emulsion zerfällt im Darm - soweit überhaupt - nur nach und nach, so daß das freiwerdende Antigen langsam, kontinuierlich und verzögert zur Resorption kommt.

Der Impfschutz, der von einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien bewirkt wird, ist ebenso groß wie nach der Gabe der Suspension allein. Diese Schlußfolgerung ist aus dem weitgehend gleichartigen Verhalten der Gruppen B und E des Hauptversuches zu schließen. Bei einer isolierten Betrachtung könnte dieses Resultat zu der Annahme verleiten,

daß das komplette Freundsche Adjuvans sich gegenüber dem spezifischen Immunisierungsvorgang indifferent und neutral verhält. Also so, wie es im Versuch VII beim Olivenöl beobachtet wurde. Die Ergebnisse der übrigen Versuche lassen diese Deutung jedoch nicht zu. Da auf der einen Seite das komplette Adjuvans ohne spezifisches Antigen (=Versuch A) und auf der anderen Seite das inkomplette Adjuvans in Kombination mit dem spezifischen Antigen (= Versuch C) jeweils einen geringen Impfschutz bewirken, ist es naheliegend, die durch das komplette Freundsche Adjuvans in Verbindung mit dem spezifischen Antigen erreichte Wirkung als die Summation verschiedener Teilwirkungen aufzufassen. Demnach müßten am Zustandekommen des Impfschutzes folgende Faktoren beteiligt sein:

1. Unspezifische Resistenzsteigerung durch die im Mineralöl suspendierten Mykobakterien (Analog Versuch A)
2. Spezifische Immunisierung durch das in der wässrigen Emulsionsphase inkorporierte Antigen (Analog Versuch C)
3. Eine Steigerung der spezifischen Abwehrleistungen durch den unspezifischen Reiz von Mineralöl und Mykobakterien (Analog den Verhältnissen bei parenteraler Applikation)
4. Den Faktoren 1 bis 3 entgegengerichtet ist die Reduzierung der zur Wirkung kommenden Antigenmenge durch die Nichtresorbierbarkeit der stabilen Mineralölemulsion.

Die Summe dieser verschiedenen Vorgänge vermag den durch die einfache wässrige Suspension von S. typhi murium-Bakterien induzierten Impfschutz nicht zu übertreffen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Ergebnisse des Stabilitätsversuches I, des Persorptionsversuches VI, des Hauptversuches VIII

und die weiter oben dargestellten theoretischen Überlegungen zur Persorption sich zu einem einheitlichen Bild ergänzen. Danach bleibt die Wasser-in-Öl-Emulsion aus Freundschem Adjuvans während der Passage des Magen-Darm-Kanals zum größten Teil stabil. Da die Emulsion in diesem Zustand nicht resorbiert werden kann, geht das inkorporierte Antigen in entsprechendem Umfang mit dem Faeces verloren. Nur das aus dem instabil gewordenem Anteil der Emulsion stammende Antigen wird wahrscheinlich resorbiert. Als logische Folge zeigen die Versuchsergebnisse keine Potenzierung, sondern eine Reduzierung des spezifischen Impfschutzes. Bei Verwendung des inkompletten Adjuvans ist dieser Effekt sehr deutlich, beim kompletten Adjuvans wird er durch zusätzliche unspezifische Resistenssteigerung durch die Mykobakterien wahrscheinlich kompensiert und damit kaschiert. Unter diesen Umständen müssen das inkomplette und komplette Freundsche Adjuvans als ungeeignet für die Verbesserung der oralen Immunisierungsmethodik angesehen werden.

Zum Abschluß der Diskussion habe ich in den folgenden vier Punkten die gravierenden Nachteile zusammengestellt, welche eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus Freundschem Adjuvans gegenüber einer einfachen wässrigen Suspension des Antigens hat.

1. Die Vorbereitung und Durchführung der oralen Immunisierung wird arbeitsintensiver, aufwendiger und kostspieliger.
2. Die Dosierung wird durch die "therapeutische Breite" des Mineralöls begrenzt.
3. Der spezifische Schutz gegen eine nachfolgende Belastungsinfektion wird durch das komplette Freundsche Adjuvans nicht gesteigert, durch das inkomplette Adjuvans sogar erheblich verschlechtert.
4. Die Methode ist in der Humanmedizin nicht anwendbar, weil
   a) bei Gebrauch des kompletten Adjuvans die Gefahr einer tuberkulinallergischen Reaktion besteht und
   b) Mineralöle als kanzerogen gelten. Die Anwen-

dung des Freundschen Adjuvans beim Menschen wird von der Herstellerfirma Difco ausdrücklich untersagt.

Das Freundsche Adjuvans nimmt unter den Adjuvantien in vielfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein. Eine seiner Eigentümlichkeiten besteht darin, nur dann seine Wirkung zu entfalten, wenn es als Ölphase mit der wässrigen Antigenphase in Form einer Wasser-in-Öl-Emulsion kombiniert wird. Diese für die parenterale Applikation geltende Aussage wurde bei den vorliegenden Versuchen zur oralen Immunisierung übernommen. Die Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß gerade diese besondere Form der Verbindung von Antigen und Adjuvans eine Steigerung des Impferfolges bei der oralen Immunisierung verhindert, da aufgrund des Mißverhältnisses zwischen der Partikelgröße der Emulsion und den Grenzgrößen für die zelluläre Resorption und die parazelluläre Persorption keine enterale Aufnahme der stabilen Emulsion erfolgt. Unter diesen Voraussetzungen ist der Gedanke naheliegend, dieses Mißverhältnis durch direkte Suspension des bakteriellen Antigens in der Ölphase zu beseitigen. Daß eine einfache Ölsuspension des Antigens unter bestimmten Umständen gleichwertige Ergebnisse wie eine Wasser-in-Öl-Emulsion liefert, konnte von WAKSMAN und MORRISON (1o7) gezeigt und von FINGER (29) bestätigt werden. Bei der Verwendung von Salmonellen als Antigen scheint diese Form der Applikation jedoch nicht geeignet zu sein. Wie MARIOTTI-BIANCHI (68) und BRUNI (12) berichten, wurden von 1912 ab die Soldaten der italienischen Armee mit einem polyvalenten Lipovaccin TAB parenteral gegen Typhus schutzgeimpft. Das in diesem Lipovaccin enthaltene Vaselinöl sollte durch eine verzögerte und gleichmäßige Resorption des Antigens die Allgemeinreaktionen verringern und die Zahl der notwendigen Injektionen reduzieren. Der durch das Lipovaccin bewirkte Impfschutz war jedoch

so schlecht, daß schon bald die Zahl der an Typhus Erkrankten in der Armee relativ höher war, als unter der nicht geimpften Zivilbevölkerung. Außerdem fiel auf, daß an den Injektionsstellen lokale Reaktionen inform von fibrinösen Verdickungen und sterilen Abszessen auftraten. Aus diesen Gründen wurde - angeblich mit großem Erfolg - das Mineralöl durch ein vegetabiles Öl ersetzt.

Interessante Parallelen zu dieser Fragestellung ergeben sich aus tierexperimentellen Immunisierungsversuchen von RIBI, BREHMER et al. (88, 89). Die Autoren suspendierten zunächst lyophilisierte mykobakterielle Zellwände in Mineralöl, stellten dann unter Zusatz von Tween 8o als Emulgator eine Öl-in--Wasser-Emulsion her und injizierten diese intravenös. Gemessen an der Immunität gegen eine nachfolgende aerogene Belastungsinfektion bewirkte diese Emulsion einen guten spezifischen Impfschutz, während die Zellwände allein oder das Mineralöl allein wirkungslos waren. Dieses Ergebnis ließ sich mit dem synthetischen Kohlenwasserstoff 7-n-hexyloctadekan reproduzieren, nicht jedoch mit Silikonöl, Kerosin oder vegetabilen Ölen. Die Autoren zeigten, daß dieser Effekt davon abhängt, daß sich die in dem Öl suspendierten Zellwände an der Grenzfläche zwischen Ölphase und Wasserphase anordnen. Das ist der Fall bei mykobakteriellen Zellwänden in Mineralöl und 7-n-hexyloctadekan, nicht jedoch bei den übrigen Testsubstanzen. Ähnliche Untersuchungen mit Zellwänden von Salmonellen erbrachten das Resultat, daß mit gleichartigen Öl-in-Wasser-Emulsionen keine Verbesserung des Impfschutzes gegenüber einfachen wässrigen Suspensionen zu erzielen war. Bei mikroskopischer Prüfung der Emulsion zeigte sich, daß lyophilisierte Zellwände von den Salmonellen im Gegensatz zu den Zellwänden von Mykobakterien keine stabile Bindung mit den Öltröpfchen eingehen. Auch mit anderen, oben zum

Teil nicht genannten Ölarten war eine Koppelung von Öl und Zellwänden nicht möglich (BRÄHMER, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieses besonderen Verhaltens, das als " Ölphobie der Salmonellen " bezeichnet werden könnte, ist im Falle der Verwendung von Impfstoffen aus Zellwandmaterial von Salmonellen durch ein ölines Adjuvans keine Verbesserung des Impferfolges zu erzielen.

F. Zusammenfassung

Anhand des von RAETTIG entwickelten Infektionsmodelles wurde geprüft, inwieweit das Freundsche Adjuvans in seiner kompletten und inkompletten Modifikation geeignet ist, den Erfolg der oralen Immunisierung der weißen Maus mit S. typhi murium-Bakterien zu verbessern.
Alle oral immunisierten Versuchstiere erhielten an 10 aufeinander folgenden Tagen eine Gesamtdosis von $1{,}5 \times 10^9$ hitzeinaktivierten S. typhi murium-Bakterien. Als vergleichende Meßgröße wurde die Endmortalität am 25. Tag nach einer oralen Belastungsinfektion mit virulenten S. typhi murium-Bakterien gewählt.

1. Durch orale Immunisierung mit hitzeinaktivierten S. typhi murium-Bakterien in Form einer wässrigen Suspension wird die Endmortalität gegenüber einer unvorbehandelten negativen Kontrollgruppe hochsignifikant gesenkt. Im Gegensatz dazu wird der epidemische Ablauf, welcher mit fallenden Maxima der Tagesmortalität am 10., 15., 19. und 22. Tag post infect. das typische wellenförmige Bild einer Explosionsepidemie mit nachfolgenden Kontaktepidemien beschreibt, nicht beeinflußt.

2. Das Freundsche Adjuvans verhält sich bei oraler Gabe nicht indifferent. Nur Einzeldosen in der Größenordnung von 0,01 ml und Gesamtdosen von 0,1 ml werden ohne nachweisliche Schädigung der Tiere vertragen.

3. Das komplette Freundsche Adjuvans vermag allein , d.h. in Abwesenheit des spezifischen Antigens, die Endmortalität geringfügig, aber noch signifikant zu senken. Diese Wirkung beruht höchstwahrscheinlich auf einer unspezifischen Resistenzsteigerung durch die in dem Mineralöl suspendierten Mykobakterien.

4. Durch orale Immunisierung mit einer Wasser-in-Öl Emulsion aus inkomplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien wird die Endmortalität signifikant gesenkt, jedoch ist der Impferfolg wesentlich schlechter als bei Gabe der wässrigen Antigensuspension allein.
Durch in-vitro-Stabilitätsversuche, Resorptionsversuche mit virulenten S. typhi murium-Bakterien und vergleichende Betrachtung zwischen der Partikelgröße der stabilen Emulsion und den Grenzgrößen der enteralen Resorptions- und Persorptionsmechanismen kann nachgewiesen werden, daß der weitaus größte Anteil der Emulsion während der gastro-intestinalen Passage stabil bleibt und in diesem Zustand nicht resorbiert werden kann. Der in der stabilen Emulsion inkorporierte und damit verlorengehende Antigenanteil erklärt den beobachteten Wirkungsverlust. Die Stabilität der Wasser-in-Öl-Emulsion, Voraussetzung für die Wirksamkeit des Freundschen Adjuvans bei parenteraler Applikation, wird somit bei oraler Gabe zum limitierenden Faktor.

5. Durch orale Immunisierung mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freundschen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien wird ein Impfschutz erreicht, welcher demjenigen nach Gabe der Antigensuspension allein entspricht.
Dieses scheinbar indifferente Verhalten des Freundschen Adjuvans kann als ausgleichender Summationseffekt verschiedener Vorgänge - besonders des Verlustes an spezifischem Antigen aufgrund der Nichtresorbierbarkeit der Emulsion einerseits und der unspezifischen Resistenzsteigerung durch die Mykobakterien andererseits - wahrscheinlich gemacht werden.

6. Der belastbare Impfschutz, welcher durch die subcutane Gabe einer Wasser-in-Öl-Emulsion aus komplettem Freund-

schen Adjuvans und einer wässrigen Suspension von S. typhi murium-Bakterien aufgebaut wird, erreicht nicht den durch die orale Immunisierung mit einer einfachen wässrigen Antigensuspension erzielten Erfolg. Dieses Ergebnis ist besonders in Bezug auf das ungewöhnlich günstige Verhältnis der parenteralen zur oralen Antigengesamtdosis von 1:3 bemerkenswert.

7. Olivenöl ist bei der oralen Immunisierung – wie bekanntlich auch bei parenteraler Applikation – als Adjuvans ungeeignet. Es verhält sich bei der gewählten niedrigen Dosierung völlig indifferent. Diese Beobachtung kann durch die hohe Instabilität der Wasser-in-Öl-Emulsion aus Olivenöl erklärt werden.

8. Durch keine der oben beschriebenen Immunisierungsmethoden wird die anfangs geschilderte Rhythmik des epidemischen Ablaufs wesentlich verändert.

9. Nach oraler Gabe von virulenten S. typhi murium-Bakterien sind diese bereits nach 15 Minuten im strömenden Blut nachweisbar. Der Kurvenverlauf dieser Resorptionsbakteriämie mit einem Maximum bei 30 Minuten weist eine hohe Übereinstimmung mit der von anderen Untersuchern gefundenen Resorptionskinetik von apathogenen und pathogenen Viren und Pilzen auf.

Literatur

1) ARLOING,F., NOEL,R., MARTIN,J.-F. SPASSITSCH,B. : Etude histologique du foie et de l'intestine dans l'anaphylaxie digestive expérimental du Cobaye.

C.r.Soc. Biol. (Paris) 93, 528, 1925

2) BAKER,J.R. : Quart. J. micr. Sci. 84, 73, 1942
Zitiert nach: FRAZER, A.C.(32)

3) BECKER, H. : Ueber Meerschweinchenversuche, durch Chemikalien die Resorption von rectal appliziertem Diphterieserum zu erhöhen.

Z. Immun.-Forsch, 64, 114, 1929

4) BERLIN,B.S., Mc. KINNEY,R.W. : A simple device for making emulsified vaccines.

J.Lab. clin. Med. 52, 657, 1958

5) BESREDKA,A. : Die lokale Immunisierung. (Deutsche Übersetzung von G.Blumenthal)
Leipzig 1926, Verlag Barth.

6) BESREDKA,A. : Über lokale Immunisierung. (Übersetzt von Dr.F.Lewy, Berlin)

Naturwissenschaften 17, 395, 1927

7) BLOOR,W.R. : On fat absorption.
II. Absorption of fat-like substances other than fats.

J. Biol. Chem. 15, 1o5, 1913

8) BRADLY, H.C.
GASSER,H.S. : Intestinal absorption.

J. Biol. Chem. 11, , 1912

9) BROTZU,G. : Un esperimento di vaccinazione antitifica per via orale.

Policlinico sez. prat, 31, 867, 1924
Zitiert nach: Zbl. ges. Hyg. 9, 164, 1925

1o) BROTZU, G.
OTTOLENGHI,D. : Studi sulle vaccinazioni antitifica.
I. Vari effetti secundo la via di somministrazione.

Bull. sci. med. (Bologna) 5, 2o1, 1927
Zitiert nach: Zbl. hes. Hyg. 16, 638, 1928

11) BROTZU,G.
OTTOLENGHI,D. : Studi sulle vaccinazioni antitifica. II.

Bull. sci. med. (Bologna) 6, 213, 1928
Zitiert nach: Zbl. ges. Hyg. 19, 275, 1929

12) BRUNI, N. : La vaccinazione antitifica con il lipovaccino T.A.B. nell'esercito italiano.

Giorno med. mil. 75, 637, 1927
Zitiert nach: Zbl. ges. Hyg. 19, 485, 1929

13) CANNON, P.R. : The problem of lipid pneumonia.

J. Amer. med. Ass. 115, 2176, 194o

14) CASALS, J.
FREUND, J. : Sensitization and antibody formation in monkeys injected with tubercle bacilli in paraffin oil.

J. Immunol. 36, 399, 1939

15) CANTACUZENE
PANAITESCU : Zitiert nach FRÄNKEL, E. (30)

16) PASTEUR, L.
CHAMBERLAND,
ROUX, : Zitiert nach KLÜCHIN und WIGODTSCHIKOFF. (54)

17) CHANNON, H.J.
COLLINSON, G.A. : The absorption of liquid paraffin from the alimentary tract in the rat and the pig.

Biochem. Journal 23, 676, 1929

18) CHARLES, CLINTOCK, Mc. KING, : Zitiert nach FRÄNKEL, E. (30)

19) DIETRICH, W. : Resorption von Tetanusgift durch den Darm.

Klin. Wschr. 1, 1160, 1922

20) DOLMAN, C.E. : Oral immunication

Am. J. M. Sc. 215, 327, 1948

21) DONDERS, C.F. : Untersuchungen über den Übergang fester Moleküle in das Gefäßsystem.

Z. rat. Med. (neue Folge) 1, 415, 1851

22) DUNBAR : Zur Frage über die Gesundheitsschädlichkeit von Erdölrückständen, die zur Zeit in grossen Maassstabe im Bäckereibetriebe verwendet werden.

Dtsch. med. Wschr. 22, 33, 1896

23) EBEL, D. : Über die Permeabilität der Darmschleimhaut für artfremde Proteine.

Z. f. Kinderheilkunde 79, 8, 1957

24) EHRLICH,P. : Experimentelle Untersuchungen über Immunität.

Dtsch. med. Wschr. 17, 976, 1218, 1891

25) FICKER,M. : Einfluß des Hungers auf die Bakteriendurchlässigkeit des Intestinaltraktes.

Arch. Hyg. 54, 354, 1905

26) FICKER,M. : Über den Einfluß der Erschöpfung auf die Keimdurchlässigkeit des Intestinaltraktes.

Arch. Hyg. 57, 56, 1906

27) FINGER,H. : Das Freundsche Adjuvans, Wesen und Bedeutung.

Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1964

28) FINGER,H. : Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Wirkungsweise des Freundschen Adjuvans.

Arch. Hyg. Bact. 146, 61, 1962

29) FINGER,H. : Der Einfluß von Avil und Solu-Decortin H auf die Experimentelle "allergische" Encephalomyelitis des Meerschweinchens und Kaninchens.

Z. ges. exp. Med. 135, 276, 1961

30) FRÄNKEL,E. : Über den gegenwärtigen Stand der peroralen Immunisierungmethoden.

Med. Klinik. 5, 1927, 157

31) FRÄNKEL,E.
SCHULTZ,E. : Versuche zur Frage der peroralen Immunisierung. Perorale Immunisierung bei der Maus gegen Paratyphus B.

Z. Immun.-Forsch. 53, 478, 1927

32) FRAZER,A.C. : The absorption of triglyceride fat from the intestine.

Physiol. Rev. 26, 1o3, 1946

33) FRAZER,A.C.
SCHULMAN,J.H.
STEWART,H.C. : Emusification of fat in the intestine of rat and its relationship to absorption.

J. Physiol. 1o3, 316, 1944

34) FREUND,J. : The mode of action of immunologic adjuvants.

Fortschritte der Tuberculoseforschung VII. 1956
Verlag S.Karger Basel/New York.

35) FREUND,J.
BONANTO,M.V. : The effect of paraffin oil, lanolin-like substances and Killed tubercle bacilli on immunization with diphteric toxoid and bacterium typhosum.

J. Immunol. 48, 325, 1944

36) FREUND,J.
BONANTO,M.V. : The duration of antibody-formation after injection of Killed typhoid bacilli in water-in-oil-emulsion.

J. Immunol. 52, 231, 1946

37) FREUND,J.
THOMSEN,K.J.
HOUGH,H.B.
SOMMER,H.E.
PISANI,T.M. : Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants.

J. Immunol. 6o, 383, 1948

38) FUNK,J. : Tierversuche zur oralen Impfung mit hitzeinaktivierten Fungi (Candida albicans).

Inang. Diss. Berlin 1969

39) GLOTOWA,E. : Immunisierung gegen Cholera per os.

Zbl. Bakt. I. Ref. 76,1, 1924

4o) GOLOVANOFF,M. : De la vaccination anticolibacillaire.
Etude de l'immunité locale.

C. v. Soc. Biol. 98,66o, 1928

41) GRUSKAY,F.L.
COOKE,R.F. : The gastrointestinal absorption of unaltered protein in normal infants and in infants recovering from diarrhea.

Pediatrics 16, 763, 1955

42) HAGAN,W.A.
LEVINE,P. : The pathogenicity of the saprophytic acid fast bacilli.

J. Amer. vet. Med. Ass. 81, 723, 1932

43) HAJOS,K. : Beiträge zur Actiologie der anaphylaktischen Erkrankungen.

Z. Klin. Med. 1oo, 3o9, 1924
Wien. Klin. Wschr. 595, 1924

44) HALBERT, S.P.
MUDD,S.
SMOLENS,J. : The antigenicity of shigella paradysenteriae (Flexner) in saline-in-mineraloil--emulsion.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 6o, 17, 1945

45) HENNEBERG,G. : Antigendauerreiz.

Münch. Med. Wschr. 1o2, 2223, 196o

46) HENNEBERG,G. : Antigendauerreiz.

Zbl. Bakt., I.Ref. 177, 585, 196o

47) HENRIQUES,V.
HANSEN,C. : Zur Frage der Fettresorption.

Zbl. Physiol. 14, 313, 19oo

48) HERBST,G. : Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtungen.

Göttingen 1844

49) HIDA,O.
TOYODA,H. : Aktive Immunisierung per os.

Zbl. Bakt. I. Ref. 42, 419, 1909
Originalarbeit in : Saikin-gaku-Zassi 138, 1907

50) HIRSCH,R. : Ueber das Vorkommen von Stärkekörnern im Blut und im Urin.

Z. exp. Pathol. Ther. 3, 390, 1906

51) HIRSCH,S. : Der Nutzen der prophylaktischen Immunisierung gegen Typhus.

Dsch. med. Wschr. 1676, 1928
Zbl. ges. Hyg. 19, 276, 1929

52) ISHIHARA : Japan. J. exp. Med. 9,1002, 1924
Zitiert nach: MIZUTANI (73)

53) KAUFMANN : Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie.

2. Band, 1697, 1960
Verlag Walter de Gruyter & Co. Berlin

54) KLÜCHIN,S.
WIGODTSCHIKOFF,G. : Experimentelle Bewertung der Cholera vaccinations-methode per os.
Zbl. Bakt., I. Orig. 94, 6, 1925

55) KLÜCHIN,S.
WIGODTSCHIKOFF,G. : Weitere experimentelle Untersuchungen über die Enterovaccination gegen Cholera, Thyphusabdominalis und Dysenterie.
Z. Immun.-Forsch. 42, 98, 1925

56) KÖHLER,W.
MOCHMANN,H. : Grundriß der Medizinischen Mikrobiologie.
VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1964

57) KOLLER,S. : Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.
4. Auflage. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt 1969

58) KORDES,B. : Orale Immunisierung von Mäusen mit Impfstoffen aus physikalisch inaktivierten Salmonella typhi murium Bakterien.
Inang. Diss. Berlin 1969

59) KORTH,W. : Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Trypsin auf bacterielle Toxine, Bakterienwachstum, Agglutinine und Penicillase.

Arzneim. Forsch. 4, 388, 1954

6o) KREIENBERG,W.
HARTH,O. : Verdauung und Resorption. In: Landois - Rosemann, Lehrbuch der Physiologie des Menschen.

Verlag Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 196o

61) KUTSCHER,K.H.
MEINICKE,E. : Vergleichende Untersuchungen über Paratyphus-, Enteritis- und Mäusetyphusbakterien und ihre immunisatorischen Beziehungen.

Z. Hyg. 52, 3o1, 19o6

62) LAUGHLEN,G.F. : Studies on pneumonia following naso-pharyngeal injections of oil.

Amer. J. Path. 1, 4o7, 1925

63) LOEFFLER,F. : Ueber Immunisierung per os.

Zbl. Bakt. I. Ref. 41, 163 19o8

64) LUMIERE
CHEVROTIER : Zitiert in: KLÜCHIN,S. und WIGODTSCHIKOFF,G. (55)

Zbl. Bakt. I. Org. 94, 6, 1925

65) LUSENA
ROVIDA : Immunita locale e vaccinatione per via enterica nel tifo e paratifo B.

Ricerche Sperim. Boll. Dell. Instit. Sierotherap. Milanese 5, 19, 1926

66) MANTEY : Perorale Typhusimmunisierung.

Zschr. f. Medizinalbeamte und Krankenhausärzte 2o, 488, 1926
Zbl. ges.Hyg. 14, 343, 1927

67) MARFELS,F.
MOLESCHOTT,J. : Der Uebergang kleiner fester Theilchen aus dem Darmkanal in den Milchsaft und das Blut.

Wien. med. Wschr. 4, 817, 1854

68) MARIOTTI-BIANCHI,G.B. : Il nuovo lipo vaccino "TAB" e le febri tifoidi nell'esercito nel 1927. Studio epide miologico.

Giorn.Med. mil. 76, 561, 1928
Zbl. ges. Hyg. 19, 271, 1929

69) MARWIK,G. : Tierversuche zur Inhalationsimpfung mit inaktivierten S,typhi murium--Bakterien.

Inaug. Diss. Berlin 1966

7o) MATSUOKA : Chôsen Igakkai Zasshi 2o, 725, 193o

Zitiert nach MIZUTANI

71) MELLANBY,J. : Petroleum emulsion in the intestine

J. Physiol. 64, Proc.v. xxxiii 1927

72) NEUBERG WASSERMANN,A.v. : Zitiert nach:
1. MIZUTANI (73)
2. REITER,H. (85)
3. HIRSCH,S. (51)
4. MANTEY (66)

73) MIZUTANI : Experimental studies on the (per anal) immunization by bacterial vaccines.

Acta Dermatologica Kyoto, 27, 15, 1936

74) MØLLER,K.O. : Pharmakologie
(Seite 176)
3. Auflage 1958
Benno Schwabe & Co. Verlag
Basel/Stuttgart

75) NONEVIC,A. : Versuch der Enterovaccinierung gegen Typhus abdominalis.

Profil. Med. 7, Beinert, 1928 (russisch)
Zitiert nach: Zbl. ges. Hyg. 19, 686, 1929

76) OESTERLEN,F. : Ueber den Eintritt von Kohle und anderen unlöslichen Stoffen vom Darmcanal aus in die Blutmasse.

Z. rat. Med. 5, 434, 1846

77) RAETTIG,H. : Typhusimmunität und Schutzimpfung.

Gustav Fischer Verlag, Jena, 1952

78) RAETTIG,H. : Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
1. Mitteilung
Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion.

Zbl. f. Bakt. I. Orig. 193, 398, 1964

79) RAETTIG,H. : Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
3. Mitteilung
Dosierung und Impfrhytmus bei der spezifischen Im - pfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis.

Zbl. f. Bakt. I. Orig. 197, 368, 1965

8o) RAETTIG,H. : Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
4. Mitteilung
Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis.

Zbl. f. Bakt. I. Orig. 2o4, 221, 1967

81) RAETTIG,H. : Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Virus.

Zbl. f. Bakt. I. Orig. 191, 97, 1963

82) RAETTIG,H. : Tierexperimente zur Resorptionsvirämie.

Zbl. f. Bakt. I. Orig. 192, 534, 1964

83) RAETTIG,H. : Möglichkeiten der DMSO in der experimentellen Immunologie.

Internationales DMSO-Symposium in Wien 1966. Saladurck Berlin 1966

84) RAUSS,K.
KETYI,J. : Serum- and coproantibodies in mice, immunized peroraly with Shigella flexneri.

Z. Immun.-Forsch. 127, 37, 1964

85) REITER,H. : Versuche über perorale Immunisierung.

Dtsch. med. Wschr. 52, 947, 1926

86) REITER,H.
KUROKAWA,A. : Versuche über perorale und percutane Immunisierung.

Klin. Wschr. 17, 744, 1926

87) REITER,H.
SOLDIN,M. : Versuche einer prophylaktischen Immunisierung gegen Diphterie auf peroralem Wege.

Dtsch. med. Wschr. 52, 1337, 1926

88) RIBI,E.
BREHMER,W.
MILNER,K. : Specificity of resistance to tuberculosis and to salmonellosis stimulated in mice by oil-treated cell-walls.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 124, 4o8, 1967

89) RIBI,E.
BARCLAY,W.
BREHMER,W.
ANACKER,R. : Effects of oil-treated mycobacterial cellwalls on the organs of mice.

J. Bact. 94, 1736, 1967

9o) RIST,N. : Les lésions métastatiques produites par les bacilles tuberculeux morts enrobés dans les paraffines.

An. Inst. Pasteur. 61, 121, 1933

91) RÖMPP,H. : Chemie Lexikon
Bd. III, 6. Auflage

Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart

92) SCHMIDT,A. : Neue Beobachtungen zur Erklärung und rationalen Behandlung der chronischen habituellen Obstipation.

Münch. Med. Wschr. 52, 197o, 19o5

93) SCHMUDDE,R. : Vergleichende orale, nasale und rectale Impfung von Mäusen mit inaktivierten S. typhi murium-Bakterien mit und ohne Dimethyl-sulfoxyd-Zugabe.

Inaug. Diss. Berlin 1968

94) STARZYNSKI : Zitiert nach: FRÄNKEL,E.(30)

95) STRYKER,W.A. : Absorption of liquid petrolatum ("mineral oil") from the intestine.

Arch.Patholog. 31, 670, 1941

96) STUBENRATH,F.C. : Beiträge zur Frage der Gesundheitsschädlichkeit von Vaselin, Paraffinum liquidum und Mineralöl.

Münch. med. Wschr. XLIV, 639, 1897

97) TARTINI,E. : Tumori 9, 266, 1935
Zitiert nach: STRYKER,W.A.(95)

98) TRON,G. : Intorno ad un grande esperimento di intero-vaccinazione antitifica.

Atti Soc.lombarda Sci.med. e biol. 17, 42, 1928
Zbl.ges. Hyg. 19, 275, 1929

99) TRON,G. : Ulteriore contributo allo studio della enterovaccinazione antitifoparatifica.

Boll. Ist. Sieroter. Milan. 8, 445, 1929
Zitiert nach: Zbl. Bakt., I. Ref. 96, 544, 1930

100) TWORT,C.C.
TWORT,J.M. : The fatty infiltration of the liver of mice resulting from the ingestion of medical liquid paraffin, etc.

J. Hyg. 33, 396, 1933

101) VAILLANT,L. : Note sur l'emploi du vaccin bilié de Besredka par la voie buccale dans quelques foyers épidémiques de fièvre typhoide.

An. Inst. Pasteur 2, 149, 1922

102) VERZAR,F. : Aufsaugung und Ausscheidung von Stärkekörnern.

Biochem. Z. 34, 86, 1911

103) VOLKHEIMER,G. : Über parazelluläre chylöse Resorptionsmechanismen.

Z. ges. inn. Med. 18, 949, 1963

104) VOLKHEIMER,G. : Das Phänomen der Persorption von Stärkekörnern.

" Die Stärke ", 20. Jahrgang, Heft 4, 117, 1968

105) VOLKHEIMER,G. : Persorptionsfähige Partikel in speisefertiger Nahrung.

Ernährungs-Umschau, Heft 8, 267, 1968

106) VOLKHEIMER,G. et al. : Beobachtungen zum Persorptions-Mechanismus.

Path. Microbiol. 31, 51, 1968

107) WAKSMAN,B.H. MORRISON,L.R. : Tuberculin type sensitivity to spinal cord antigen in rabbits with isoallergic encephalomyelitis.

J. Immunol. 66, 421, 1951

108) WASSERMANN,A.v. CITRON : Über die Bildungsstätte der Typhusimmunkörper.

Z. Hyg. Inf. Krk. 50, 332, 1905

109) WESTPHAL
LYDERITZ : Zitiert nach: KÜHLER,W.
MOCHMANN,H.(56)

110) WHITE,R.G.
COONS,A.H.
CONOLLY,J.M. : Studies on antibody production. IV. The role of wax fraction of mycobact. tuberculosis in adjuvant emulsions on the production of antibody to egg albumin.
J. exp. med. 102, 83, 1955

111) WOLF,K. : Immunisierung per os.
Münch. med. Wschr. 270, 1908
Zbl. Bakt. 42, 419, 1909

112) WOTTON,R.M.
ZWEMER,R.L. : Anat. Rec. 75, 493, 1939
Zitiert nach: FRAZER,A.C.(32)

113) WRIGHT : A short treatise on anti-typhoid inoculation.
Westminster, 1904
Zitiert nach: RAETTIG,H.(77)

Diese Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Professor Dr. H. Raettig, dem ich für die Überlassung des Themas und seine wertvollen und richtungsweisenden Ratschläge danken möchte.

Mein Dank gilt auch Frau Barbara Ganze für ihre freundliche und fachkundige Assistenz.

Lebenslauf

Am 3.5.1942 wurde ich, Nikolaus Graben, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Paul Graben und dessen Ehefrau Wilhelmine, geb. Buse, in Hagen geboren.
Nach vier Grundschuljahren besuchte ich ab 1953 das Städtische Gymnasium Hagen und legte dort am 26.2.1962 die Reifeprüfung ab.
Im Mai 1962 begann ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität in Berlin mit dem vorklinischen Medizinstudium, welches ich im Oktober 1964 nach fünf Semestern mit dem Physikum abschloß.
Nach zwei klinischen Semestern an der Universität zu Wien führte ich ab Herbst 1965 das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin fort und beendete es im November 1968 mit dem Staatsexamen.
In den ersten acht Monaten meiner Medizinalassistentenzeit arbeitete ich in der Abteilung für Epidemiologie und Seuchenforschung des Robert-Koch-Institutes in Berlin. Unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Raettig führte ich umfangreiche Tierversuche zur Frage der oralen Immunisierung mit Typhusbakterien durch. Der größte Teil dieser tierexperimentellen Untersuchungen ist in der vorliegenden Dissertation zusammengefaßt.
Nach Abschluß meiner Medizinalassistentenzeit und erfolgter Approbation bin ich seit dem Herbst 1970 auf der Abteilung für Nephrologie und Dialysebehandlung der Medizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Westend der Freien Universität Berlin tätig.